

ÜBER DIE STRAHLENEMPFINDLICHKEIT
VON ENZYMEN IN DER ZELLE

Sangbok Lee

1964

Aus dem Max Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt/Main

Direktor: Prof.Dr.Dr.h.c.Dr.h.c.Dr.h.c.Dr.h.c.B. Rajewsky

Über die Strahlenempfindlichkeit von Enzymen in der Zelle

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin der hohen
medizinischen Fakultät der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von

Sangbok Lee

aus Seoul, Korea

1964

Dekan : Professor Dr. O. Käser
Prodekan : Professor Dr. W. Rotter
Referent : Professor Dr. B. Rajewsky
Korreferent : Professor Dr. A. Wacker



I. Einführung und Vorbereitungen	1
II. Methode	2
1. Zielsetzung und Umfang	2
2. Darstellung der Lerninhalte	3
3. Darstellung der Lerninhalte	4
a) Darstellung der Lerninhalte	4
b) Darstellung der Lerninhalte	5
4. Darstellung der Lerninhalte	6
a) Darstellung der Lerninhalte	6
b) Darstellung der Lerninhalte	7
c) Darstellung der Lerninhalte	8
d) Darstellung der Lerninhalte	9
e) Darstellung der Lerninhalte	10
f) Darstellung der Lerninhalte	11
g) Darstellung der Lerninhalte	12
h) Darstellung der Lerninhalte	13
i) Darstellung der Lerninhalte	14
j) Darstellung der Lerninhalte	15
k) Darstellung der Lerninhalte	16
l) Darstellung der Lerninhalte	17
m) Darstellung der Lerninhalte	18
n) Darstellung der Lerninhalte	19
o) Darstellung der Lerninhalte	20
p) Darstellung der Lerninhalte	21
q) Darstellung der Lerninhalte	22
r) Darstellung der Lerninhalte	23
s) Darstellung der Lerninhalte	24
t) Darstellung der Lerninhalte	25
u) Darstellung der Lerninhalte	26
v) Darstellung der Lerninhalte	27
w) Darstellung der Lerninhalte	28
x) Darstellung der Lerninhalte	29
y) Darstellung der Lerninhalte	30
z) Darstellung der Lerninhalte	31
III. Ergebnisse	32
a) Darstellung der Ergebnisse	32
b) Darstellung der Ergebnisse	33
c) Darstellung der Ergebnisse	34
d) Darstellung der Ergebnisse	35
e) Darstellung der Ergebnisse	36
f) Darstellung der Ergebnisse	37
g) Darstellung der Ergebnisse	38
h) Darstellung der Ergebnisse	39
i) Darstellung der Ergebnisse	40
j) Darstellung der Ergebnisse	41
k) Darstellung der Ergebnisse	42
l) Darstellung der Ergebnisse	43
m) Darstellung der Ergebnisse	44
n) Darstellung der Ergebnisse	45
o) Darstellung der Ergebnisse	46
p) Darstellung der Ergebnisse	47
q) Darstellung der Ergebnisse	48
r) Darstellung der Ergebnisse	49
s) Darstellung der Ergebnisse	50
t) Darstellung der Ergebnisse	51
u) Darstellung der Ergebnisse	52
v) Darstellung der Ergebnisse	53
w) Darstellung der Ergebnisse	54
x) Darstellung der Ergebnisse	55
y) Darstellung der Ergebnisse	56
z) Darstellung der Ergebnisse	57
IV. Zusammenfassung	58
a) Darstellung der Zusammenfassung	58
b) Darstellung der Zusammenfassung	59
c) Darstellung der Zusammenfassung	60
d) Darstellung der Zusammenfassung	61
e) Darstellung der Zusammenfassung	62
f) Darstellung der Zusammenfassung	63
g) Darstellung der Zusammenfassung	64
h) Darstellung der Zusammenfassung	65
i) Darstellung der Zusammenfassung	66
j) Darstellung der Zusammenfassung	67
k) Darstellung der Zusammenfassung	68
l) Darstellung der Zusammenfassung	69
m) Darstellung der Zusammenfassung	70
n) Darstellung der Zusammenfassung	71
o) Darstellung der Zusammenfassung	72
p) Darstellung der Zusammenfassung	73
q) Darstellung der Zusammenfassung	74
r) Darstellung der Zusammenfassung	75
s) Darstellung der Zusammenfassung	76
t) Darstellung der Zusammenfassung	77
u) Darstellung der Zusammenfassung	78
v) Darstellung der Zusammenfassung	79
w) Darstellung der Zusammenfassung	80
x) Darstellung der Zusammenfassung	81
y) Darstellung der Zusammenfassung	82
z) Darstellung der Zusammenfassung	83
V. Literaturverzeichnis	84
a) Darstellung des Literaturverzeichnis	84
b) Darstellung des Literaturverzeichnis	85
c) Darstellung des Literaturverzeichnis	86
d) Darstellung des Literaturverzeichnis	87
e) Darstellung des Literaturverzeichnis	88
f) Darstellung des Literaturverzeichnis	89
g) Darstellung des Literaturverzeichnis	90
h) Darstellung des Literaturverzeichnis	91
i) Darstellung des Literaturverzeichnis	92
j) Darstellung des Literaturverzeichnis	93
k) Darstellung des Literaturverzeichnis	94
l) Darstellung des Literaturverzeichnis	95
m) Darstellung des Literaturverzeichnis	96
n) Darstellung des Literaturverzeichnis	97
o) Darstellung des Literaturverzeichnis	98
p) Darstellung des Literaturverzeichnis	99
q) Darstellung des Literaturverzeichnis	100
r) Darstellung des Literaturverzeichnis	101
s) Darstellung des Literaturverzeichnis	102
t) Darstellung des Literaturverzeichnis	103
u) Darstellung des Literaturverzeichnis	104
v) Darstellung des Literaturverzeichnis	105
w) Darstellung des Literaturverzeichnis	106
x) Darstellung des Literaturverzeichnis	107
y) Darstellung des Literaturverzeichnis	108
z) Darstellung des Literaturverzeichnis	109

I.	Einleitung und Problemstellung	1
II.	Methodik	
	A. Zellstämme und Kultur	6
	B. Herstellung der Zellsuspension	7
	C. Bestrahlungsbedingungen	
	1) Röntgenröhre und Dosierung	8
	2) Bestrahlungsgefäß	9
	D. Aufarbeitung der Zellen	10
	E. Bestimmung der Enzymaktivitäten	12
	1) Lactatdehydrogenase	16
	2) Äpfelsäuredehydrogenase	16
	3) Glukose-6-Phosphatdehydrogenase	17
	4) Aldolase	18
	5) Glutaminsäuredehydrogenase	18
	6) Glycerophosphatdehydrogenase	18
	7) Phosphoglyceraldehyddehydrogenase	19
	8) Phosphoglyceratkinase	20
III.	Ergebnisse	
	A. Dosiseffekt-Kurven und Inaktivierungsdosis	21
	B. Bestimmung des Diffusionsbereiches in der Zelle	26
	C. Bestimmung des treffertheoretischen Molekulargewichts mit Hilfe des Diffusionsmodells	32
IV.	Diskussion	
	Über die Theorie der Strahlenwirkung auf Enzyme in der Zelle	34
	Abhängigkeit der Strahlenwirkung von Milieufaktoren und von der Strahlenqualität	41
	Über das Diffusionsmodell und den Diffusionsbereich in der Zelle	45
V.	Zusammenfassung	51
	Anhang (1) : Zur Berechnung der Zahl der Elementarereignisse pro Molekül	53
	Anhang (2) : Zur Abschätzung des Anteils der indirekten Strahlenwirkung auf die Proteinmoleküle in der Zelle	54
	Anhang-Tab.A : Y-Werte (G-Werte) für die Inaktivierung von Enzymen und anderen Proteinen in verdünnter Lösung ..	57
	Anhang-Tab.B : ϕ -Werte (mittlerer Diffusionsweg) für die Inaktivierung von Enzymen	58
VI.	Literaturverzeichnis	59

I. Einleitung und Problemstellung

Die lebende Materie unterliegt auf der Erde ständig den Einwirkungen von energiereichen Strahlungen aus der natürlichen Radioaktivität und der kosmischen Strahlung. Hinzu kommt seit der Verwendung von Röntgenstrahlen und natürlichen und künstlichen Radioisotopen in Medizin und Technik eine bedeutsame Erhöhung der Strahleneinwirkung auf lebende Organismen.

Obwohl die makroskopisch beobachtbaren Strahlenwirkungen bekannt sind, sind die Kenntnisse über die Wirkungsmechanismen der ionisierenden Strahlen auf die biologischen Organismen noch unzureichend. Die entsprechenden biologischen Effekte sind die Endeffekte einer langen Kette von komplexen Folgereaktionen der Elementarereignisse. Diese Reaktionskette führt von der primären Wechselwirkung zwischen Strahlung und Materie über chemische Umsetzungen zu Veränderungen der biologischen Funktionen und strukturellen Einheiten. Trotz der heutigen Fortschritte der Strahlenbiologie verschließt sich die vollständige Aufklärung dieser elementaren Vorgänge noch unserer Kenntnis.

Bei Bestrahlung mit Röntgenstrahlen wird üblicherweise als primäres, biologisch wirksames Ereignis die Bildung eines Ionenpaares oder Ionenhäufchens im strahlenempfindlichen Bereich angenommen (92). Auf den Aufnahmen mit der WILSONschen Nebelkammer und in der Blaskammer sieht man eine statistische Verteilung der erzeugten Ionenhäufchen (120). Seit F.DESSAUER (1922(36)) behandelt man die elementaren Vorgänge der biologischen Strahlenwirkung mit statistischen Methoden. Die mathematische Formulierung gelang zuerst BLAU und ALTENBURGER (1923(17)). DESSAUER betrachtete als Treffer die Erzeugung von "Punktwärme" in einem Eiweißmolekül. Die Natur des elementaren, wirksamen Ereignisses wurde außerdem als die Bildung eines Ionenpaares (28), die Absorption

eines Strahlenquants (25), der Durchgang eines Elektrons (40) und die Bildung eines positiven Ions (66) betrachtet. POLLARD (84) nahm als Elementarereignis eine primäre Ionisation (im Mittel 3 Ionenpaare) mit einem mittleren Energieaufwand von 110 eV an.

Die klassische Treffertheorie, die nach DESSAUER durch die Arbeiten von CROWTHER (26-28), CONDON und TERRIL (25), GLOCKER (40,41), RAJEWSKY (86-88), DELBRÜCK (35), LANGENDORFF und SOMMERMEYER (65,106), TOMOFEEFF-RESSOVSKY und ZIMMER (110) und LEA (66) weiter ausgebaut wurde, nahm im allgemeinen an, daß beim Durchgang eines Strahlenquants durch den empfindlichen Bereich ein Treffer stattfinden kann. Dabei kann die Energie dieses Quants vollständig oder nur zum Teil im empfindlichen Bereich absorbiert werden. Nach dieser treffertheoretischen Vorstellung gelangt man zu dem Begriff eines "empfindlichen Bereiches", in dem sowohl das physikalische Elementarereignis, als auch die dadurch verursachten biologischen Effekte ausgelöst werden. Zuerst wurde der empfindliche Bereich mit einem Eiweißmolekül oder einem Gen identifiziert. Die Vorgänge der biologischen Strahlenwirkung in den lebenden Zellen scheinen jedoch wegen des morphologischen Aufbaues und der biochemischen Zellreaktionen komplizierter zu sein. Obwohl man in einigen Fällen mit den klassischen treffertheoretischen Vorstellungen eine befriedigende Analyse der experimentellen Befunde erzielen konnte, gelang es nicht, alle experimentellen Ergebnisse mit der Theorie in Einklang zu bringen. RAJEWSKY (86,88) wies darauf hin, daß der mathematische Formalismus der klassischen Treffertheorie keine bindenden Schlussfolgerungen hinsichtlich der wirklichen Vorgänge bei der Strahlenwirkung zu liefern vermag. Diese rein formale Vorstellung kann man auf beliebige Treffer und beliebige Individuen beziehen. Deshalb betont RAJEWSKY (88,110) nachdrücklich die Notwendigkeit, dem mathematischen Formalismus der klassischen Treffertheorie einen biophysikalischen Inhalt zu geben.

Ferner hat RAJEWSKY (86) schon 1931 zwischen den rein physikalischen Treffern im Sinne der klassischen Vorstellungen und den indirekten, "chemischen" Treffern unterschieden. RAJEWSKY zeigte, daß man nicht nur den sich aus der Theorie ergebenden empfindlichen Bereich, sondern das ganze bestrahlte Individuum (z.B. eine ganze Zelle) zur Erklärung des Mechanismus der Strahlenwirkung berücksichtigen muß.

Einerseits kann am Ort des physikalischen Primärvorganges ein Energieträger gebildet werden, der durch Diffusion an einen empfindlichen Bereich wandern und die Schädigung verursachen kann (chemischer Treffer). Andererseits können die Elementarereignisse und die daraus folgenden Veränderungen den Ablauf einer Reaktionskette auslösen, die das gesamte Individuum erfassen und zu der beobachteten makroskopischen Endreaktion führen. Ferner haben RAJEWSKY und PAULY (73, 77, 79, 76, 78) die klassische Treffertheorie durch Berücksichtigung der kinetischen Prozesse in der Zelle erweitert. Dadurch lassen sich kompliziertere Dosiseffekt-Kurven interpretieren.

Beim "chemischen" Treffer nimmt man an, daß durch einen physikalischen Primärvorgang (Ionisation oder Anregung) ein chemisch verändertes Molekül oder Radikal erzeugt wird, das zu einem empfindlichen Bereich der biologischen Einheit diffundieren kann und dann einen biologischen Effekt verursacht. Den experimentellen Nachweis dafür haben RAJEWSKY und REINHOLZ (90,89) an Pflanzensamen und Pollen bei tiefer Temperatur (-190°C), bei der eine Diffusion von Energieträgern vernachlässigbar ist, erbracht. Theoretische Untersuchungen der indirekten Strahlenwirkung wurden zuerst von RAJEWSKY (89) und SIX (105) durchgeführt. Dabei ergab sich für den mittleren Diffusionsweg der gebildeten Energieträger ein Wert von etwa $100 \text{ \AA}$. ZIRKLE und TOBIAS (121) haben ebenfalls das Diffusionsmodell mathematisch formuliert. Der von ihnen experimentell bestimmte Wert für den mittleren Diffusions-

weg beträgt ebenfalls etwa 100 Å. An zahlreichen Enzymen wurde die Inaktivierung durch Röntgen- und Korpuskular-Strahlen untersucht (74,75, 77,78,91,93,55,61,63,64). Aus den erhaltenen exponentiellen Dosiseffekt-Kurven wurden die empfindlichen Bereiche berechnet. RAJEWSKY, GERBER und PAULY (93,91,75,77,76) untersuchten die Enzyme der Atmungskette und der Glykolyse. Diese Versuche können nur befriedigend analysiert werden, wenn man das Diffusionsmodell hinzuzieht. Versuche zur Bestimmung des strahlenempfindlichen Volumens bei der Inaktivierung von Cytochrom C aus Mäuseleber ergaben einen mittleren Diffusionsweg von 150 Å (93). HUTCHINSON (54,56) hat das SIX-, ZIRKLE- und TOBIASsche Diffusionsmodell experimentell und theoretisch geprüft. Er erhielt den mittleren Diffusionsweg von etwa 30 Å. Die Bedeutung der Versuche von HUTCHINSON liegt in dem Beweis, daß der Ort der indirekten Strahlenwirkung in den Zellen eng lokalisiert und der Diffusionsbereich immer in der gleichen Größenordnung liegt, unabhängig von dem Volumen der Enzymmoleküle.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht in dem Versuch, die Inaktivierungsdosis bei verschiedenen Enzymen in der Zelle zu untersuchen und den Anteil der indirekten Strahlenwirkung von dem der direkten Strahlenwirkung zu trennen. Als Maß für die indirekte Strahlenwirkung in den Zellen ist die Größe des mittleren Diffusionsbereichs zu bestimmen. Die Länge des Diffusionsweges der in wäßriger Lösung gebildeten Radikale ist ein Maß für ihre Wirksamkeit, vorausgesetzt, daß der Diffusionsvorgang limitierend ist. Es wurden die Enzyme Lactatdehydrogenase, Aldolase, Glycerophosphatdehydrogenase, Phosphoglyceralddehyddehydrogenase und Phosphoglyceratkinase aus der EMBDEN-MEYERHOFschen Glykolyse, Äpfelsäuredehydrogenase und Glutaminsäuredehydrogenase aus dem Citronensäurecyclus und dessen Nebenkette und

Glukose-6-Phosphatdehydrogenase aus dem Pentosephosphatcyclus verwendet. Weiterhin sollte der mittlere Diffusionsweg für diejenigen Enzyme, für die das Molekulargewicht bekannt ist, bestimmt werden.

II. Methodik

A. Zellstämme und Kultur

Es wurde die Enzym-Inaktivierung durch Röntgenstrahlen bei Ehrlich-Aszites-Tumorzellen (EAT-Zellen) der Mäuse bestimmt. Die Mäuse eignen sich gut als Versuchstiere, weil sie leicht gezüchtet werden können. EAT-Zellen können verhältnismäßig rein gewonnen werden. Die hier benutzten EAT-Zellen stammen aus den Farbwerken Höchst. Sie wurden im Max Planck-Institut für Biophysik weiter überimpft. Die Überimpfung wurde folgendermaßen durchgeführt: Die Mäuse wurden mit Standarddiät ernährt. Das Gewicht der 3-4 Monate alten Versuchstiere betrug 20-25 g. Die Impfung wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Etwa zwei Wochen nach der Impfung wurden die Tiere mit Chloroform getötet und die Tumorzellen möglichst ohne Blutung aus der Bauchhöhle mit einer 10 ml Spritze entnommen. Die Zellkonzentration an EAT-Zellen in der Bauchhöhle ist zu diesem Zeitpunkt am günstigsten (Abb.1).

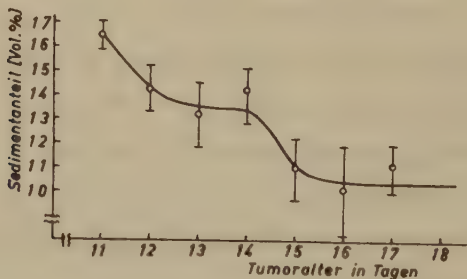


Abb.1 Sedimentanteil von Maus-EAT-Zellen in Abhängigkeit vom Tumoralter. Es ist der mittlere Fehler der Einzelmessungen angegeben.

B. Herstellung der Zellsuspension

Die EAT-Zellen wurden als milchige Suspension aus der Bauchhöhle entnommen. Die Suspension enthielt außer EAT-Zellen noch wenige Erythrozyten und andere Verunreinigungen. Um möglichst reine EAT-Zellen zu gewinnen, wurde die Suspension mit eisgekühlter Krebs-Ringer-Lösung durch dreifache kurzzeitige (etwa 2 Minuten) Zentrifugation getrennt. Sie enthielt danach weniger als 1 % Leukozyten, weniger als 4 % Erythrozyten und Verunreinigungen, z.B. Bestandteile von während der Aufarbeitung geplatzten Zellen, Thrombozyten, Fett-Tröpfchen (Abb.2).

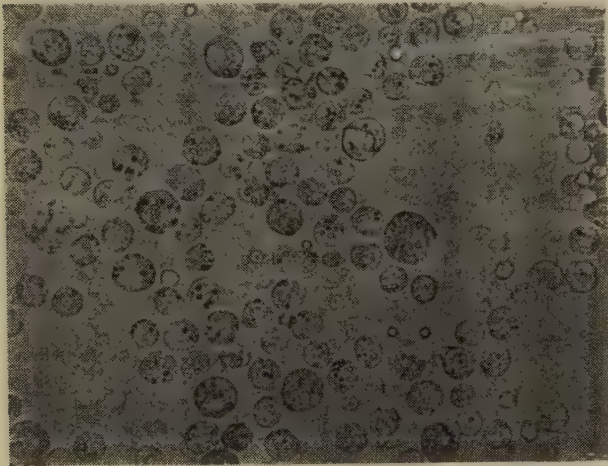


Abb. 2: Mikroskopisches Bild der EAT-Zellen-Suspension.

Vergrößerung 440fach.

Nach nochmaligem, 15 Minuten langem, hochtourigem (6000 U/Min.) Zentrifugieren in der Junior II-Zentrifuge wurde das Zellsediment zum Versuch verwendet. Dabei befanden sich noch etwa 25 % Krebs-Ringer-Lösung zwischen den Zellen. Die Zellsuspension wurde

möglichst schnell und unter eisgekühlten Bedingungen hergestellt. Die verwendete Krebs-Ringer-Phosphat-Lösung enthielt: 0,90 % NaCl (0,154M); 1,15 % KCl (0,154M); 1,22 % CaCl_2 (0,11M); 2,11 % KH_2PO_4 (0,154M); 3,82 % $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1,30 % NaHCO_3 ; 0,1 M Phosphat-Puffer, pH 7,4. Etwa 1 g gepacktes EAT-Zellsediment enthält ungefähr $5 \cdot 10^8$ Zellen. Der mittlere Durchmesser der Zellen beträgt etwa 15μ .

C. Bestrahlungsbedingungen

1) Röntgenröhre und Dosierung

Um möglichst kurze Bestrahlungszeiten zu bekommen, wurde als Strahlenquelle die Hochleistungsröntgenröhre II nach RAJEWSKY und HEUSE(45) im Max Planck-Institut für Biophysik benutzt (Abb.3).

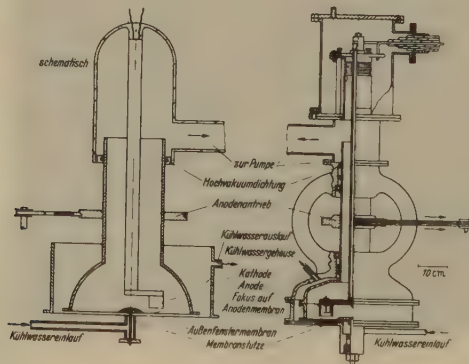


Abb. 3 Schematische Darstellung. Hochleistungsröntgenröhre mit rotierender, wassergekühlter Membrananode von RAJEWSKY, HEUSE und HEUSS.

EAT-Zellenschicht im Schälchen ist dabei im Mittel etwa 3 mm. Es wurde in Stickstoff-Atmosphäre bei 4°C bestrahlt (Abb. 5a und 5b).

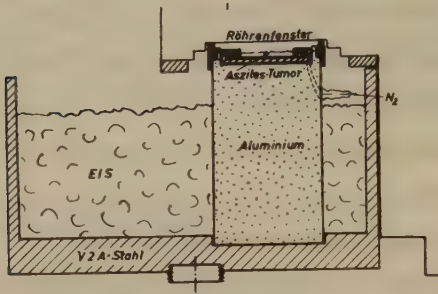


Abb. 5a

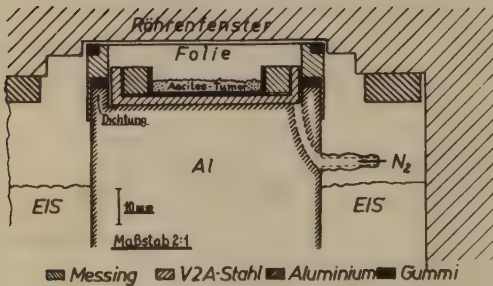


Abb. 5b

Abb. 5a und 5b : Bestrahlungsgefäß mit Röhrenfenster

D. Aufarbeitung der Zellen

Zur Aufarbeitung wurden die Zellen direkt nach der Bestrahlung mit 5 ml destilliertem Wasser verdünnt. Die Zellsuspensionen wurden zur Zerstörung der Zellmembranen mit Zell-Homogenisator, Homogenisator und Emulgator behandelt. Außerdem wurden Toluol-Aufschluß und Einfrieren mit flüssiger Luft angewendet. Um die Wirksamkeit der oben beschriebenen Methoden zu vergleichen, wurde die Lactatdehydrogenase (LDH)-Aktivität bestimmt. Dabei zeigte die Methode des Einfrierens

mit flüssiger Luft die höchste Enzym-Aktivität (Tab. 1).

ZELL-AUFSCHLUSS METHODE	AKTIVITÄT DER ENZYME [$\frac{OE}{mg}$] [mm ³ /ml]
HOMOGENISATOR	0,771
ZELL-HOMOGENISATOR	0,505
EMULGATOR	0,703
TOLUOL-LYSE	0,843
SCHÜTTELN	0,569
EINFRIEREN 1mal	0,954
" " 2 "	1,046
" " 3 "	1,084
" " 5 "	1,093
" " 6 "	1,118
" " 7 "	1,185

Tab. 1 Enzymaktivität nach verschiedenen Zell-Aufschlußverfahren

Zum Erreichen der Höchstaktivität wurde das Einfrieren verschieden häufig vorgenommen. Wie Abb. 6 zeigt, ist die weitere Erhöhung der Enzymaktivität nach 3-maligem Einfrieren nur außerordentlich klein.

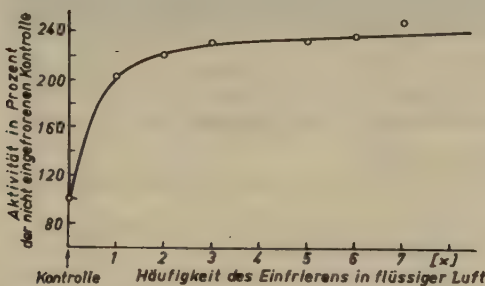


Abb. 6 LDH-Aktivität von EAT-Zellen nach Behandlung mit flüssiger Luft

Deshalb wurde zur Aufarbeitung der Zellen 4-maliges Einfrieren mit Luft angewandt. Nach dem Einfrieren mit flüssiger Luft wurde die Zellsuspension mit Triäthanolamin-Hydrochlorid-Puffer (TRA-P) verdünnt, bis die gewünschten optimalen Verhältnisse erreicht wurden.

Die oben beschriebene Aufarbeitung erfolgte in einem Eisbad in möglichst kurzer Zeit. Der mikroskopische Befund der Zellsuspension nach 4-maligem Einfrieren zeigte eine homogene Suspension ohne Zellmembran (Abb. 7).



Abb. 7 Mikroskopisches Bild der EAT-Zellen-Suspension nach
4-maligem Einfrieren und Auftauen mit flüssiger Luft.
Vergrößerung 440fach

E. Bestimmung der Enzymaktivitäten

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten erfolgte mit dem von WARBURG und CHRISTIAN (113,115) angegebenen optischen Test. Die Änderung der Extinktion ΔE des zugesetzten DPN-H bzw. TPN wurde im Spektrallinienphotometer "Eppendorf" bei $\lambda = 366 \text{ m}\mu$ gemessen. Allgemein wurde soviel DPN-H bzw. TPN zugesetzt, wie einem ΔE von 0,7 entsprach. Die Enzymaktivität wurde durch die Geschwindigkeit der Reaktion, die durch das Enzym katalysiert wird, bestimmt. Die Geschwindigkeit, mit der der Photometerzeiger über die Skala wandert, ent-

spricht der Geschwindigkeit der chemischen Reaktion, nämlich der zeitlichen Abnahme des reagierenden Stoffes, bzw. der zeitlichen Zunahme des Reaktionsproduktes. DPN(-H) bzw. TPN^(-H) haben bei 260 m μ und 340 m μ ein Absorptionsmaximum (Abb. 8).

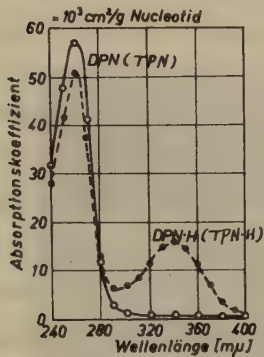


Abb. 8

Ultraviolett-Absorptionsspektrum
der Pyridinnukleotide

Nach P. KARLSON, Biochemie,
G. Thieme Verlag, 1961. S. 85

Da die Absorption bei 260 m μ auf den Adeninanteil des Moleküls zurückzuführen ist (113), erfolgt sie auch bei den dehydrierten Molekülen und ist daher für den Test nicht geeignet. Dagegen absorbiert bei 340 m μ nur die hydrierte Form.

Nach dem LAMBERT-BEERSchen Gesetz gilt:

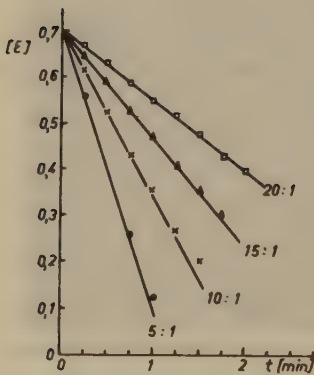
$$\log \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot c \cdot d.$$

Dabei ist : I_0 = Intensität des eingestrahnten Lichtes, I = Intensität des aus der Meßküvette austretenden Lichtes, ϵ = Extinktionskoeffizient (cm²/Mol), c = Konzentration des absorbierenden Stoffes (Mol/cm³), d = Schichtdicke der Meßküvette (cm).

Unter dieser Voraussetzung ist die Extinktionsänderung der Konzentration des DPN-H bei 366 m μ direkt proportional. Da die zeitliche Konzentrationsabnahme des DPN-H der von ihm als Coenzym katalysierten

Enzymreaktion direkt proportional ist, zeigt die Extinktionsänderung die Reaktionsaktivität des untersuchten Enzyms, wenn die Enzyme in Sättigungskonzentration vorhanden sind. Unter der Geschwindigkeit einer Enzym-Reaktion wird die Anfangsgeschwindigkeit verstanden. Ihr Wert wird aus der Steigung der Umsatzkurve entnommen (Abb. 9).

Abb. 9



DPN-H-Extinktionsänderungen in Abhängigkeit von der Zeit bei verschiedener Homogenat-Konzentration. LDH-Aktivität in EAT-Zellen. Als Parameter ist an den Kurven der Verdünnungsgrad des getesteten Homogenats, verglichen mit der Konzentration des Ausgangshomogenates angegeben. Zum Zeitpunkt $t = 0$ wurde das Substrat zugesetzt.

Da enzymkatalysierte Reaktionen empfindlich gegen Temperaturänderungen sind (der Temperaturkoeffizient der Reaktionsgeschwindigkeit beträgt etwa 10 % pro Grad), wurde in diesem Versuch die Temperatur mit einem Thermostat ("Thermomix-II", Fa. B. Braun) konstant auf $25,0^{\circ} \text{C} \pm 0,1^{\circ} \text{C}$ gehalten. Die Temperatur wurde stets mit einem Thermometer überprüft (Abb. 10).

Alle Enzyme haben einen optimalen pH-Bereich ihrer Wirksamkeit, der häufig sehr schmal ist; deshalb wurde $1/5 \text{ m}$ TRA-P mit 1 n HCl auf den gewünschten pH-Wert eingestellt, unter Zusatz von Äthylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz ("Trilon") als Schwermetallfänger. Bei Stei-

gerung der Substrat-Konzentration erreicht die Geschwindigkeit enzymkatalysierter Reaktionen einen Höchstwert. Bei weiterer Erhöhung der Substrat-Konzentrationen ändert sich nach der Gleichung von MICHAELIS-MENTEN die Geschwindigkeit nicht mehr. Viele Enzyme werden jedoch durch ein übergroßes Substratangebot gehemmt. Daher wurden in diesem Versuch die Enzyme mit Substrat gerade abgesättigt.

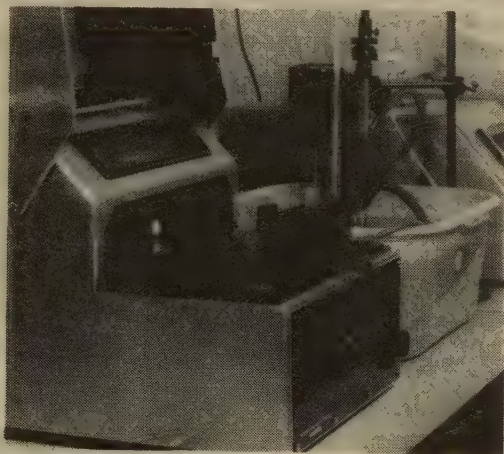


Abb. 10 Bild des Eppendorf-Photometers mit Thermomix und Wasserbad

Die Reaktionsküvette ist aus Quarzglas, mit einer Bodenfläche von 1 cm^2 , einer Höhe von 4,5 cm und einer Wanddicke von 0,1 cm. Das Testvolumen der Lösungen war etwa 2,1 ml. Durch Reaktion bei Zugabe des Coenzyms zeigte sich eine deutliche Extinktions-Abnahme. Deshalb wurde 1 min. bis zum Stillstand der Reaktion gewartet und dann erst mit der Zugabe des Substrates begonnen. Danach wurde mit einem Glasstab umgerührt, der Photometerzeiger auf $\Delta E = 0,7$ eingestellt und alle 15 Sekunden die Extinktion abgelesen. Die Dauer eines Versuches betrug etwa 4 Minuten.

Die Präparate für die Bestimmung der Enzym-Aktivitäten wurden von der Fa. Boehringer & Söhne, Mannheim-Waldhof, geliefert : Glycero-phosphatdehydrogenase (GDH), Phosphoglyceraldehyddehydrogenase (PGADH), Diphosphopyridinnukleotid in reduzierter Form (DPN-H), Triphosphopyridindinukleotid (TPN), Adenosintriphosphat (ATP), Glukose-6-Phosphat-Natriumsalz(G-6-P-Na), Fruktosediphosphat-Natriumsalz (FDP-Na), Brenztraubensäure-Natriumsalz (BTS-Na), Oxalessigsäure (OA), α -Ketoglutar-säure (KG), Dehydrooxyacetonphosphat (DAP) und 3-Phosphoglyconsäure in Bariumsalz (3-PGS). Ammoniumacetat, Hydrazinsulfat, KOH und Trilon wurden von der Fa. E.Merck, Darmstadt, bezogen. Bariumsalz wurde mit Na_2CO_3 umgesetzt. Der pH-Wert 8,4 - 8,6 für die DPN-H-Lösungen und pH-Wert 6,4 für die TPN-Lösungen wurde mit $1/15 \text{ m Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ eingestellt. Für die Herstellung aller anderen Lösungen wurde quartzdestilliertes Wasser verwendet. Alle Lösungen wurden bei $2 - 4^\circ\text{C}$ kühl aufbewahrt und vor direktem Licht geschützt. Sie wurden nach der Herstellung nicht länger als 10 Tage benutzt.

Die Reaktionslösungs-Ansätze für die Bestimmung der Enzymaktivitäten waren folgende (15,68,48) :

1) Lactatdehydrogenase (LDH)

1,5 ml $1/5 \text{ m TRA-P}$, pH 9,6; 0,5 ml EAT-Zellhomogenat; 0,05 ml $1 \cdot 10^{-2} \text{ m DPN-H}$; 0,05 ml $6,3 \cdot 10^{-2} \text{ m BTS-Na}$.

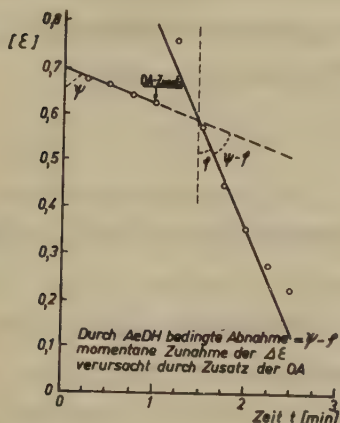
Es wurde bei pH 9,6 gemessen, obwohl der optimale pH-Wert der LDH bei 7,6 liegt. Obwohl die Enzymaktivität bei dem pH-Wert 9,6 relativ niedrig ist, hat es jedoch den Vorteil, daß man in der gleichen Küvette die Äpfelsäuredehydrogenase bestimmen kann (Abb. 11).

2) Äpfelsäuredehydrogenase (AeDH)

1,5 ml $1/5 \text{ m TRA-P}$, pH 9,6; 0,5 ml EAT-Zellhomogenat; 0,05 ml $1 \cdot 10^{-2} \text{ m DPN-H}$; 0,05 ml $6,3 \cdot 10^{-2} \text{ m BTS-Na}$; 0,05 ml 1 m OA .

Da die Oxalalessigsäure in Lösung spontan decarboxyliert - also BTS entsteht - war es nötig, zunächst die LDH mit BTS abzusättigen. Nach 1 - 2 Minuten wurde OA zugegeben. Es kam daraufhin zu einer Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit, die sich zu der durch die LDH bedingten addiert. Die Differenz entspricht dem auf die AeDH entfallenden Anteil (Abb. 11). Dabei ist vorausgesetzt, daß sich die beiden Reaktionen nicht beeinflussen. Diese Annahme ist jedoch wegen des DPN-H-Überschusses berechtigt.

Abb. 11



Zur Aktivitätsbestimmung der LDH und AeDH im gleichen Versuchsan-
satz: DPN-H-Extinktionsänderung
in Abhängigkeit von der Zeit. ψ und
 φ charakterisieren die Reaktions-
geschwindigkeit der einfachen LDH-
Reaktion und der Summenreaktion von
LDH und AeDH mit dem DPN-H, ihre
Differenz $\psi - \varphi$ die der AeDH-Reak-
tion allein.

Es wurde daher die AeDH- und LDH-Aktivität in einem Ansatz bestimmt.
Der optimale pH-Bereich der AeDH liegt bei pH 9,5 - 9,7; bei pH 7,4
war nur eine außerordentlich geringe Aktivität des Enzyms zu messen.

3) Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (G-6-PDH)

1,5 ml 1/5 m TRA-P, pH 8,0; 0,5 ml EAT-Zellhomogenat; 0,1 ml $1 \cdot 10^{-2}$ m
TPN; 0,05 ml 1 m $MgSO_4$; 0,05 ml 1/10 m G-6-P-Na.

Da G-6-PDH nicht mit Hilfe des Coenzyms DPN-H, sondern TPN katalysiert
wird, erfolgt bei der Messung der G-6-PDH-Aktivität eine zeitliche
Zunahme der Konzentration des TPN-H (Abb. 12).

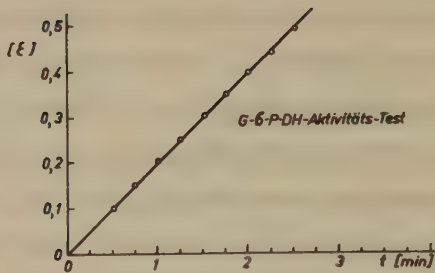


Abb. 12 G-6-PDH-Aktivitäts-Test in EAT-Zellhomogenaten. Zunahme der $\text{TPN}_H^{\#}$ -bedingten Extinktion im zeitlichen Reaktionsablauf; linearer Verlauf wegen Überschusses an Substrat (= G-6-P-Na).

4) Aldolase (ALD)

1,5 ml TRA-P, pH 7,4; 0,5 ml EAT-Zellhomogenat; 0,05 ml $1 \cdot 10^{-2}$ m DPN-H;
0,05 ml $1/10$ m FDP-Na.

Kontrollversuche mit zugesetzter GDH zeigten, daß die in den Zellen vorhandene GDH ausreicht, um die durch ALD bedingte Reaktion als limitierende Reaktion zu messen. Die Reaktion läuft nach Zusatz von FDP-Na zunächst langsam an, um nach einigen Minuten ihre volle Geschwindigkeit zu erreichen, die für mindestens 10 min. konstant bleibt.

5) Glutaminsäuredehydrogenase (GsDH)

1,5 ml $1/5$ m TRA-P, pH 8,0; 0,5 ml EAT-Zellhomogenat; 0,05 ml $1 \cdot 10^{-2}$ m DPN-H; 0,05 ml Ammoniumacetat; 0,05 ml $1/2$ m KG.

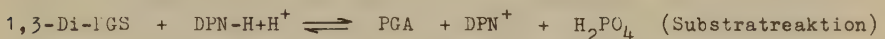
6) Glycerophosphatdehydrogenase (GDH)

1,5 ml $1/5$ m TRA-P, pH 7,4; 0,5 ml EAT-Zellhomogenat; 0,05 ml $1 \cdot 10^{-2}$ m DPN-H; 0,5 ml $2 \cdot 10^{-3}$ m DAP.

7) Phosphoglyceraldehyddehydrogenase (PGADH)

1,5 ml 1/5 m TRA-P, pH 7,4; 0,5 ml EAT-Zellhomogenat; 0,05 ml $1 \cdot 10^{-2}$ m DPN-H; 0,05 ml 1 m MgSO_4 ; 0,15 ml $1 \cdot 10^{-2}$ m ATP; 0,3 ml 1/10 m Hydrazinsulfat; 0,5 ml 1/10 m 3-PGS; 0,05 ml 2 n KOH.

Da in den Zellen Triosephosphat-Isomerase vorhanden ist, war es notwendig, das Enzym nach dem von BÜCHER (15) angegebenen "Rücktest", der sich der Rückreaktion, ausgehend von 3-PGS, bedient, mit einer Hilfsreaktion zu prüfen. Zur Verschiebung der Reaktionsgleichgewichte wurde Hydrazinsulfat als Aldehydfänger eingesetzt. Unter Vorschaltung der Hilfsreaktion verläuft dann die Substratreaktion folgendermaßen :



Da Phosphoglyceratkinase (PGK) in EAT-Zellen ebenso wie in amderem Gewebe im Überschuß über PGADH vorhanden ist, wie der Zusatz zu PGADH zeigt, ist in dem oben angegebenen Test die PGADH auch ohne Zusatz von PGK bestimmend für die Geschwindigkeit des Reaktionsablaufes. Bei der Stellung der 3-PGS im EMBDEN-MEYERHOF-Schema ist jedoch außer der Reaktion über PGK und PGADH auch ein geringerer Abbau der 3-PGS über den zweiten Abbauweg zur Milchsäure möglich (Via 2-PGS, PBZS, BTS mit LDH zur Milchsäure). Es mußte daher geklärt werden, ob die gemessene Abnahme an DPN-H ein Maß für die Aktivität der PGADH ist und nicht eine Beteiligung der LDH vorliegt. Es wurde schon in EAT-Zellen und Leberzellen bewiesen (48,68), daß in dem Rücktest der untere Abbauweg der 3-PGS zum Teil miterfaßt wird und die Werte für die Aktivität der PGADH daher um etwa 30 % zu hoch liegen. Der Rücktest ist nach BÜCHER (15) weniger genau hinsichtlich der Proportionalität zur zugesetzten Enzymmenge als der von WARBURG (114) angegebene Arsenat-Test. Für unsere Fragestellung - Strahlenempfindlichkeit der Enzyme - ist jedoch

diese Tatsache von untergeordneter Bedeutung, weil es hier im wesentlichen auf das Verhältnis der Aktivität der bestrahlten Enzyme zur Aktivität der Kontrollen ankommt.

8) Phosphoglyceratkinase (PGK)

1,5 ml $1/5$ m TRA-P, pH 7,4; 0,5 ml EAT-Zellhomogenat; 0,05 ml $1 \cdot 10^{-2}$ m DPN-H; 0,05 ml MgSO_4 ; 0,15 ml $1 \cdot 10^{-2}$ m ATP; 0,3 ml $1/10$ m Hydrazin-sulfat; 0,5 ml $1/10$ m 3-PGS; 0,05 ml 2 n KOH; 0,05 ml PAGDH.

III. Ergebnisse

A. Dosiseffekt-Kurven und Inaktivierungsdosis

Die Fragestellung, ob der Tod eines Säugetieres, das mit einigen 100 r bestrahlt wurde, eine Folge der Röntgenstrahleninaktivierung lebenswichtiger Enzyme ist, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht. Es wurde eine Reihe von Enzymen aus dem Kohlenhydratstoffwechsel von EAT-Zellen untersucht.

Abb. 13 bis Abb. 24 zeigen die Dosiseffekt-Kurven von LDH, AeDH, ALD, IGADH, GDH, G-6-PDH, GsDH und PGK nach Röntgenbestrahlung in Stickstoff-Atmosphäre bei 4°C. Die Enzyme wurden in vivo, nach der auf S. 8 - 10 beschriebenen Versuchsanordnung bestrahlt. Der Verlauf der Dosiseffekt-Kurven der Enzyme ist exponentiell. Als statistische Fehlerbreite ist an den Kurven der dreifache mittlere Fehler der Mittelwerte, berechnet nach der GAUSS-Verteilung, angegeben, also der 95 % - Vertrauensbereich. Der durch die Meßmethodik bestimmte Fehler in der Enzymaktivität ist gegeben durch den Fehler in der Homogenatkonzentration beim optischen Test von ± 3 % (aus Wäge- und Pipettierfehlern), die Temperaturschwankungen beim optischen Test von $\pm 0,1^\circ\text{C}$. und die Ablesegenauigkeit am Photometer von etwa ± 5 %. Nach dem GAUSSschen Fehlerfortpflanzungsgesetz errechnet sich insgesamt ein Fehler der Enzymaktivität von ± 4 %. Diese Schwankungsbreite stimmt recht gut mit dem mittleren Fehler der Mittelwerte der Messungen überein, dessen dreifacher Wert in den Kurven angegeben ist.

Die Abbildungen 13 - 24 zeigen eine exponentielle Abnahme der Enzymaktivität mit der Strahlendosis. Es ist daher sinnvoll, die Strahlenempfindlichkeit der einzelnen Enzyme durch die Dosis zu charakterisieren, nach deren Verabreichung die Enzymaktivität auf 37 % der Kontrolle abgefallen ist. Man nennt diese Dosis die Inaktivierungsdosis (D_{37})

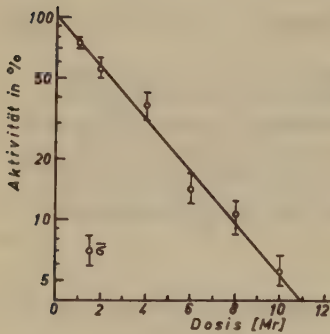


Abb. 13
Röntgenstrahleninaktivierung
von LDH in EAT-Zellen. Be-
strahlung unter N_2 -Atmosphäre
bei $4^\circ C$

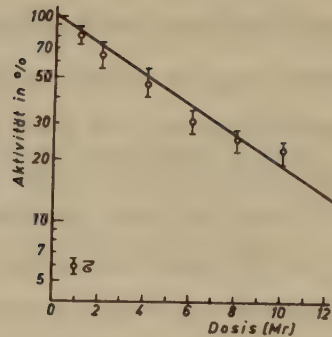


Abb. 14
Röntgenstrahleninaktivierung von
AEDH in EAT-Zellen. Bestrahlung
unter N_2 -Atmosphäre bei $4^\circ C$

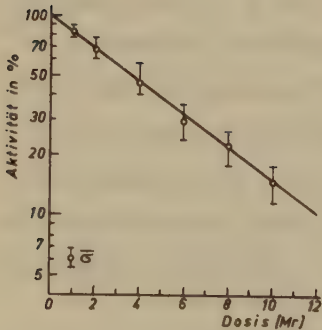


Abb. 15
Röntgenstrahleninaktivierung
von ALD in EAT-Zellen. Be-
strahlung unter N_2 -Atmosphäre
bei $4^\circ C$

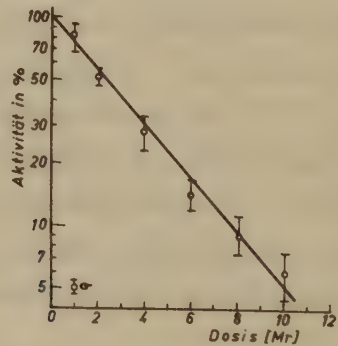


Abb. 16
Röntgenstrahleninaktivierung von
PGADH in EAT-Zellen. Bestrahlung
unter N_2 -Atmosphäre bei $4^\circ C$

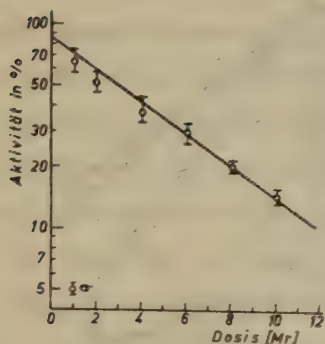


Abb. 17

Röntgenstrahleninaktivierung
von GDH in EAT-Zellen. Be-
strahlung unter N_2 -Atmosphäre
bei $4^\circ C$

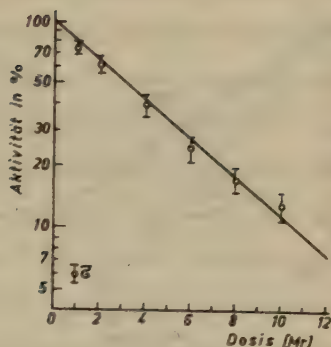


Abb. 18

Röntgenstrahleninaktivierung von
G-6-PDH in EAT-Zellen. Bestrah-
lung unter N_2 -Atmosphäre bei $4^\circ C$

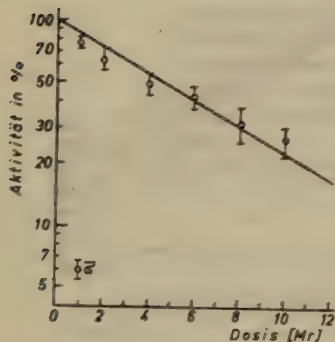


Abb. 19

Röntgenstrahleninaktivierung
von GsDH in EAT-Zellen. Be-
strahlung unter N_2 -Atmosphäre
bei $4^\circ C$

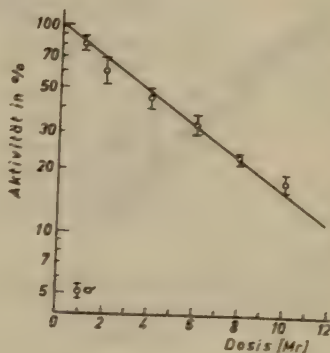


Abb. 20

Röntgenstrahleninaktivierung von
PGK in EAT-Zellen. Bestrahlung
unter N_2 -Atmosphäre bei $4^\circ C$

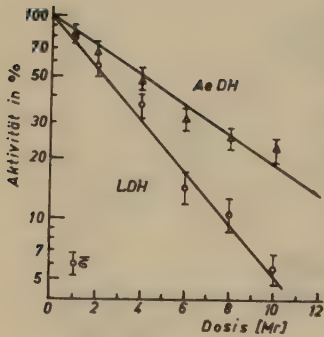


Abb. 21
Röntgenstrahleninaktivierung
von LDH und AeDH in EAT-Zellen.
Bestrahlung unter N_2 -Atmosphäre
bei $4^\circ C$

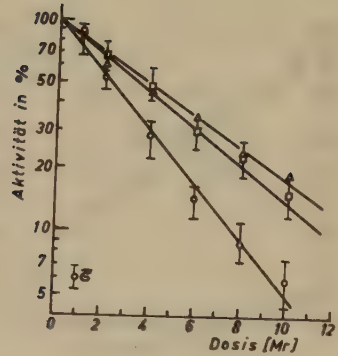


Abb. 22
Röntgenstrahleninaktivierung von
 Δ :PGK, $\square$:ALD, $\circ$:PGADH in EAT-Zellen.
Bestrahlung unter N_2 -Atmosphäre
bei $4^\circ C$

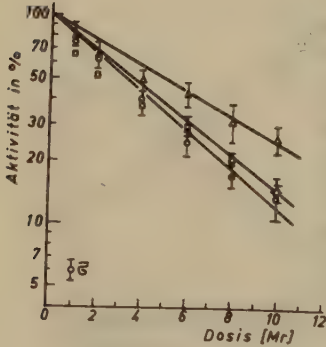


Abb. 23
Röntgenstrahleninaktivierung
von $\circ$:G-6-PDH, Δ :GsDH, $\square$:GDH
in EAT-Zellen. Bestrahlung
unter N_2 -Atmosphäre bei $4^\circ C$

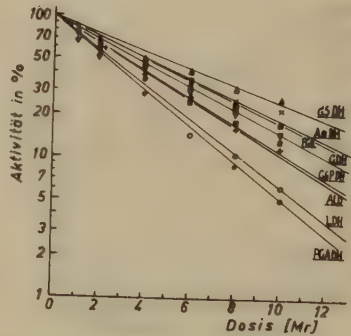


Abb. 24
Röntgenstrahleninaktivierung von
 $\circ$:LDH, Δ :GsDH, $\square$:G-6-PDH, $+$:ALD,
 $\times$:AeDH, ∇ :GDH, $\bullet$:PGADH, $\blacksquare$:PGK in
EAT-Zellen. Bestrahlung unter
 N_2 -Atmosphäre bei $4^\circ C$

Wie weiter unten in der Diskussion deutlich wird (s.S. 34-38), läßt der gefundene exponentielle Verlauf der Dosiseffektkurven vermuten, daß die Inaktivierungsprozesse durch ein einziges, im Enzymmolekül wirk-sames Ereignis erfolgen. Aus den Abbildungen 13 - 24 entnimmt man Werte der D_{37} zwischen $3 \cdot 10^6$ und $7 \cdot 10^6$ r. Der Fehler in der Inaktivie-rungsdosis setzt sich zusammen aus den Meßfehlern der Enzymaktivität und der Dosisleistungsbestimmung. Er errechnet sich zu ± 5 %. Diese, verglichen mit der 50 % - Letaldosis bei Säugetieren von einigen 100 r, sehr hohen Strahlenresistenzen der Enzyme im Protoplasma weisen darauf hin, daß der Tod eines Säugetieres nach Bestrahlung nicht durch primäre Strahlenwirkung auf die Enzyme verursacht sein kann.

Um den Zusammenhang zwischen dem Molekulargewicht und der Strahlen-empfindlichkeit zu verdeutlichen, sind in Tabelle 2 die Molekularge-wichte und die D_{37} -Werte für die einzelnen verwendeten Enzyme darge-stellt.

	Molekulargew. der Enzyme	Inaktivierungs- Dosis [D_{37}]
PHOSPHOGLYCEROKINASE	34 000	$5,6 \cdot 10^6$ r
APFELSÄUREDEHYDROGENASE	62 000	$6,0 \cdot 10^6$ r
GLUKOSE-6-PHOSPHAT-DH	?	$5,0 \cdot 10^6$ r
GLYCEROPHOSPHAT-DH	78 000	$4,8 \cdot 10^6$ r
PHOSPHOGLYCERALDEHYD-DH	117 000	$3,2 \cdot 10^6$ r
LACTATDEHYDROGENASE	120 000	$3,5 \cdot 10^6$ r
ALDOLASE	148 000	$4,8 \cdot 10^6$ r
GLUTAMINSÄURE-DH	1 000 000	$6,5 \cdot 10^6$ r

Tab. 2 Das Verhältnis der Inaktivierungsdosis zum Molekular-gewicht der Enzyme

Aus Tabelle 2 ergibt sich näherungsweise umgekehrte Proportionalität zwischen der Inaktivierungsdosis und dem Molekulargewicht, mit Aus-nahme der Werte bei der Glutaminsäuredehydrogenase. Unter der Annahme von einem Energieaufwand von 100 eV pro inaktiviertes Molekül wurde der strahlenempfindliche Bereich (Wirkvolumen) der Enzyme berechnet

und in Tabelle 3 mit dem Volumen des Enzymmoleküls verglichen. Das Verhältnis zwischen beiden beträgt etwa 2 - 3.

	V_1 : Volumen des Enzymmoleküls (cm^3)	V_2 : Wirk- Volumen (cm^3)	$\frac{V_2}{V_1}$
PHOSPHOGLYCEROKINASE	$0,43 \cdot 10^{-19}$	$2,84 \cdot 10^{-19}$	66
APFELSÄUREDEHYDROGENASE	$0,79 \cdot 10^{-19}$	$2,69 \cdot 10^{-19}$	34
GLUKOSE-6-PHOSPHAT-DH	?	$3,18 \cdot 10^{-19}$	-
GLYCEROPHOSPHAT-DH	$0,995 \cdot 10^{-19}$	$3,32 \cdot 10^{-19}$	25
PHOSPHOGLYCERALDEHYD-DH	$1,49 \cdot 10^{-19}$	$4,95 \cdot 10^{-19}$	33
LACTATDEHYDROGENASE	$1,56 \cdot 10^{-19}$	$4,55 \cdot 10^{-19}$	29
ALDOLASE	$1,89 \cdot 10^{-19}$	$3,32 \cdot 10^{-19}$	18
GLUTAMINSÄURE-DH	$12,75 \cdot 10^{-19}$	$2,44 \cdot 10^{-19}$	0,19

Tab. 3 Der Vergleich des Wirkvolumens mit dem Volumen
des Enzymmoleküls

Eine bemerkenswerte Tatsache ist, daß bei Glutaminsäuredehydrogenase das gesamte strahlenempfindliche Volumen kleiner als das Molekularvolumen des Enzymmoleküls ist. Man kann annehmen, daß nur ein Teil des gesamten Moleküls inaktiviert und daß dieser Teil des Gesamtmo-
leküls für die katalysatorischen Funktionen des Enzyms verantwortlich ist. Wegen des außerordentlich großen Molekulargewichtes ist es verständlich, daß ein einziges Elementarereignis im Gesamt-molekül nicht genügt, um das gesamte Molekül zu inaktivieren. Nur, wenn ein minimal großer Energiebetrag in den empfindlichsten, für die katalysatorischen Funktionen verantwortlichen Teil fällt, wird das Molekül inaktiviert. Es gibt zahlreiche Ergebnisse, bei denen das treffertheoretische Molekulargewicht kleiner als das physikalisch-chemisch bestimmte Molekulargewicht ist (99,100,98,85).

B. Bestimmung des Diffusionsbereiches in der Zelle

Ein strahlenbiologischer Effekt in der Zelle wird im allgemeinen sowohl durch die direkte wie durch die indirekte Strahlenwirkung ausgelöst. Wie man aus der Tabelle 3 sieht, ist der strahlenempfindliche

Bereich des Enzyms um einen Faktor 2 - 3 größer, als das Volumen des Enzymmoleküls. Daher vermutet man nach RAJEWSKY (89,92), daß der strahlenempfindliche Bereich nicht nur das Volumen des Enzymmoleküls umfaßt, sondern auch das das Enzymmolekül umgebende Wirkvolumen oder den Diffusionsbereich, aus dem die von der absorbierten Strahlenenergie in der Umgebung gebildeten Energieträger zu dem Enzymmolekül diffundieren (Abb. 25).

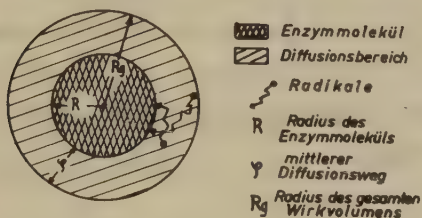


Abb. 25

Diffusionsmodell-
Schema

Zur Bestimmung des Umfanges der indirekten Strahlenwirkung auf das Enzymmolekül in der vorliegenden Untersuchung wurde der mittlere Diffusionsweg der Energieträger berechnet. Die Näherungsrechnung geschah mit Hilfe der weiter unten beschriebenen Theorie des Diffusionsmodells (s.S.45).

Ist N die Zahl der Enzymmoleküle, die nach der Dosis D (gemessen in 100 eV/g) nicht inaktiviert sind und N_0 die Zahl der bestrahlten Enzymmoleküle, so ist der Bruchteil N/N_0 , der nach einer Dosis D noch aktiv ist, durch folgende Gleichung gegeben :

$$\frac{N}{N_0} = e^{-\alpha D} \quad (1a)$$

oder mit $D' = \rho D$, wobei ρ die Dichte in Gramm pro Kubikzentimeter bedeutet

$$\frac{N}{N_0} = e^{-\alpha' D'} \quad (1b)$$

Dabei ist D' die Dosis in 100 eV pro Kubikzentimeter und $\alpha = f \cdot \alpha'$.

Die Dosis der Dosiseffektkurve muß von r auf 100 eV/g oder 100 eV/cm³ Einheiten umgerechnet werden; α und α' werden als Wirkungskoeffizienten bezeichnet, wobei α in Gramm pro 100 eV und α' in Kubikzentimeter pro 100 eV angegeben sind.

Ist α_d der Wirkungskoeffizient für die direkte Strahlenwirkung und α_{in} der Wirkungskoeffizient für die indirekte Strahlenwirkung, dann lautet die Dosiseffekt-Funktion :

$$\frac{N}{N_0} = e^{-(\alpha_d + \alpha_{in}) D} \quad (2a)$$

Unter Benutzung der Dichte der Enzymmoleküle f_d und der Dichte des umgebenden Mediums f_{in} , folgt :

$$\frac{N}{N_0} = e^{-(f_d \cdot \alpha'_d + f_{in} \cdot \alpha'_{in}) D} \quad (2b)$$

Für die Inaktivierungsdosis bei Bestrahlung des Enzyms in der wasserhaltigen Zelle (D_{37}^f) gilt demnach

$$\frac{1}{D_{37}^f} = f_d \cdot \alpha'_d + f_{in} \cdot \alpha'_{in} \quad (3)$$

Bestrahlt man das Enzym in der getrockneten Zelle, so entfällt die Inaktivierung durch indirekte Strahlenwirkung. Die Dosiseffekt-Funktion lautet dann

$$\frac{N}{N_0} = e^{-f_d \cdot \alpha'_d D} \quad (4)$$

Somit erhält die Inaktivierungsdosis für die direkte Strahlenwirkung in trockenen Zellen (D_{37}^t) :

$$\frac{1}{D_{37}^t} = f_d \cdot \alpha'_d \quad (5)$$

D_{37}^t wurde aus dem bekannten Molekulargewicht unter der Annahme berechnet, daß die Deponierung einer mittleren Energie von 100 eV im Volumen des Moleküls dieses inaktiviert.

Man erhält somit :

$$\frac{1}{D_{37}^f} - \frac{1}{D_{37}^t} = f_{in} \cdot \alpha'_{in} \quad (6)$$

Für die Dichte des Mediums f_{in} kann man etwa den Wert 1 einsetzen, da sie im wesentlichen durch Wasser bestimmt ist.

Aus der Theorie des Diffusionsmodells, begründet von RAJEWSKY (89), SIX (105) und PAULY (75), als auch von ZIRKLE und TOBIAS (121) und HUTCHINSON (56), folgt für :

$$\alpha'_{in} = Y \cdot 4\pi R^2 \varphi \left(1 + \frac{\varphi}{R} \right) q \quad (7)$$

Daraus ergibt sich für den mittleren Diffusionsweg :

$$\varphi = -\frac{R}{2} + \sqrt{\left(\frac{R}{2}\right)^2 + \frac{\alpha'_{in}}{Y \cdot 4\pi R q}} \quad (8)$$

Y ist hierbei die Ausbeute, d.h. die Zahl der umgewandelten Moleküle pro 100 eV absorbierter Strahlenenergie. Der Wert von Y hängt von der Art der inaktivierten Moleküle ab. Tabelle A im Anhang zeigt Literaturwerte für Y für eine Reihe von Enzymen. Die Werte schwanken zwischen 3,0 und 0,1. Da in der vorliegenden Untersuchung die Ausbeute nicht bestimmt wurde, wurden zur Berechnung des mittleren Diffusionsweges für jedes Enzym vier verschiedene Werte von Y zwischen 0,1 und 3 verwendet. Abbildung 26 zeigt die nach Gleichung (8) zu erwartende starke Abhängigkeit des mittleren Diffusionsweges φ von Y. In Tabelle 4 sind die nach Gleichung (8) berechneten mittleren Diffusionswege für die untersuchten Enzyme angegeben.

Tab. 4 : Bestimmung des mittleren Diffusionsweges
in EAT-Zellhomogenaten. N₂ , 4°C.

Enzym	Inaktivierungs- Dosis		$f_{d_i} \cdot d_{d_i} +$ $f_{in} \cdot d_{in}$	d_{in}	q	Y	γ
	$\cdot 10^{-6}$ (r)	$\cdot 10^{-18}$ (100eV/g)	$\cdot 10^{19}$ ($\bar{c}/100\text{eV}$)	$\cdot 10^{19}$ ($\text{cm}^3/100\text{eV}$)			(%)
LDH	3,5	2,20	4,55	3,05	1	3	6
"	"	"	"	"	"	1	16
"	"	"	"	"	"	0,3	38
"	"	"	"	"	"	0,1	75
AeDH	6,0	3,74	2,69	1,90	1	3	6
"	"	"	"	"	"	1	14
"	"	"	"	"	"	0,3	32
"	"	"	"	"	"	0,1	63
ALD	4,8	3,02	3,32	1,43	1	3	2
"	"	"	"	"	"	1	5
"	"	"	"	"	"	0,3	19
"	"	"	"	"	"	0,1	42
PGADH	3,2	2,02	4,95	3,46	1	3	7
"	"	"	"	"	"	1	17
"	"	"	"	"	"	0,3	39
"	"	"	"	"	"	0,1	76
PGK	5,6	3,53	2,84	2,41	1	3	9
"	"	"	"	"	"	1	21
"	"	"	"	"	"	0,3	44
"	"	"	"	"	"	0,1	65
GDH	4,8	3,02	3,32	2,33	1	3	6
"	"	"	"	"	"	1	15
"	"	"	"	"	"	0,3	34
"	"	"	"	"	"	0,1	81

In Tab. 4 bedeuten :

- α'_d = Wirkungskoeffizient für den direkten Treffer ($\text{cm}^3/100 \text{ eV}$),
berechnet nach Gleichung (5) (s.S. 28)
- α'_{in} = Wirkungskoeffizient für den indirekten Treffer ($\text{cm}^3/100 \text{ eV}$),
berechnet aus Versuchsergebnissen nach Gleichung (6) (s.S. 29)
- ρ_d = Dichte des Enzymmoleküls (g/cm^3); 1,3 gesetzt
- ρ_{in} = Dichte des umgebenden Mediums (g/cm^3); 1 gesetzt
- q = Eine Konstante (56) (s.S.46); wird 1 gesetzt
- Y = Ausbeute ; Zahl der umgewandelten Moleküle pro 100 eV
absorbierter Strahlenenergie; Variationsbreite aus Literaturwerten (s. Anhang S. 57)
- φ = mittlerer Diffusionsweg der Energieträger

Die Werte für den mittleren Diffusionsweg schwanken, wie man Tabelle 4 entnimmt, zwischen 6 Å und 80 Å. Diese starke Schwankung ist durch die große Variationsbreite von Y zu erklären, die den hauptsächlichsten Unsicherheitsfaktor der Bestimmung ausmacht, Man ersieht aus der Tabelle 4 und Abbildung 26 jedoch, daß die berechneten mittleren Diffusionswege für einen festen Y -Wert, besonders bei den höheren Werten, für die einzelnen Enzyme recht gut übereinstimmen.

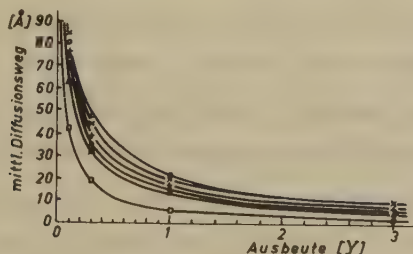


Abb. 26 Der mittlere Diffusionsweg in Abhängigkeit von Ausbeute Y , bzw. G -Wert. $\circ$: LDH, $\square$: ALD, Δ : AeDH, $\bullet$: GDH, $+$: PGADH, $\times$: PGK

Die bei konstant angenommenem $\bar{Y}$ -Wert beobachteten Schwankungen in φ dürften vor allem auf die Verschiedenartigkeit der Enzyme selbst zurückzuführen sein, die für jedes Enzym einen anderen Wert von $\bar{Y}$ erforderten. Die Variationsbreite von φ für festen $\bar{Y}$ -Wert stimmt jedenfalls recht gut mit der Streuung der Literaturwerte von φ für verschiedene Enzyme überein (s. Anhang - Tabelle B).

C. Bestimmung des treffertheoretischen Molekulargewichts
mit Hilfe des Diffusionsmodells

Das Molekulargewicht der G-6-PDH ist bis jetzt unsicher. Die einzige Angabe in der Literatur findet sich bei KIRKMAN et al (122). Sie bestimmten aus Messungen an der Ultrazentrifuge ein Molekulargewicht des dimeren Moleküls ^{von} 105 000, weisen aber gleichzeitig auf die Unsicherheit dieses Wertes hin. Wie POLLARD und seine Mitarbeiter (82-85) nachgewiesen haben, stimmt bis auf den Faktor 2 oder 3 das Wirkvolumen des bestrahlten Eiweißmoleküls in getrocknetem Zustand und im Vakuum mit dem Volumen des Moleküls überein. Dann kann man umgekehrt aus der experimentell bestimmten Inaktivierungsdosis das Molekulargewicht in grober Näherung bestimmen. Solche Versuche wurden durchgeführt (LEA (66,67), POLLARD et al (82-85)).

Man kann das Wirkvolumen der indirekten Strahlenwirkung durch eine vereinfachte Überschlagsrechnung erhalten, indem man von dem experimentell bestimmten gesamten Wirkvolumen den Diffusionsanteil abzieht. Unter der Annahme eines mittleren Energieaufwandes von 100 eV pro inaktiviertes Molekül und einer Dichte von 1 Gramm pro Kubikzentimeter wurde aus der experimentell bestimmten D_{37} ein formales strahlenempfindliches Volumen ermittelt. Vom Radius dieses kugelförmig angenommenen Volumens wurde eine Diffusionsstrecke von 30 Å ab-

gezogen. Aus dem so ermittelten Wert für den Radius des Enzymmoleküls ergab sich ein Molekulargewicht von etwa 100 000.

Wegen der stark vereinfachenden Voraussetzungen ist jedoch dieser Wert mit einer großen Unsicherheit behaftet. Man bekommt dadurch aber eine Information über die Größenordnung des G-6-PDH-Moleküls.

IV. Diskussion

Über die Theorie der Strahlenwirkung auf Enzyme in der Zelle

Bei den hier beschriebenen Versuchen ergeben sich exponentielle Dosiseffekt-Kurven. Die exponentielle Dosiseffekt-Kurve deutet man im allgemeinen als Eintreffer-Reaktion. Man erhält ebenfalls eine exponentielle Dosiseffekt-Kurve, wenn eine kumulative Wirkung von mehreren Treffern vorliegt und die exponentielle Kurve von einer geeigneten Verteilung der Strahlenempfindlichkeit oder der Treffvolumina verursacht wird (44). Einige Arbeiten zeigen, daß Eintreffer-Kurven durch ein heterogenes Objektgemisch vorgetäuscht werden können (65,16). Deshalb muß die Frage geklärt werden, ob sich ein Objektgemisch angeben läßt, bei dem durch Überlagerung von Mehrtrefferfunktionen mit begrenzter Trefferzahl eine exakte, einfache Exponentialkurve zustandekommt, die dann eine Eintreffer-Reaktion vortäuschen könnte.

DITTRICH (37) zeigte, daß das möglich ist. Ein solcher Fall ist jedoch sehr unwahrscheinlich, weil dabei eine von der Normalverteilung erheblich abweichende Verteilung der Trefferzahl und Treffbereiche vorausgesetzt werden muß. Eine exponentielle Überlebenskurve wird nach HALL (44) durch kumulative Wirkung der Mehrtreffer nur in dem Fall verursacht, wenn die bestrahlten Objekte eine exponentielle Verteilung der Strahlenempfindlichkeit besitzen, die a priori unwahrscheinlich ist. Ein weiterer Grund für diese Unwahrscheinlichkeit liegt darin, daß die Effekte unabhängig von der Dosisleistung sind, denn eine kumulativwirkung der Effekte kann von der Dosisleistung abhängig sein (44). Für die Inaktivierung der Enzymmoleküle ist diese Vortäuschung einer Eintreffer-Reaktion durch Mehrtreffer-Objekte

höchst unwahrscheinlich. Es besteht eine Heterogenität des Enzymmoleküls bei verschiedenen Zellen. Die Heterogenität in den Zellen der Mäuse, die gleichaltrig sind und gleicher Zucht entstammen, kann man vernachlässigen. Daher ist in der vorliegenden Arbeit die Heterogenität des Materials ausgeschlossen. Deshalb muß die exponentielle Dosiseffekt-Kurve in diesem Versuch als Eintreffer-Kurve, genauer, als eine Dosiseffekt-Kurve, die auf ein Einzelereignis zurückgeht, interpretiert werden.

Welche Inaktivierungsprozesse könnte man bei diesen exponentiell verlaufenden Dosiseffekt-Kurven erwarten? Was bedeutet überhaupt "Eintreffer-Reaktion"? Unter einem Treffereignis im Sinne der Treffertheorie verstehen wir hier die chemische Änderung eines Enzymmoleküls, nämlich die Inaktivierung seiner katalysatorischen Fähigkeit durch ein Energiedepot im Molekül selbst oder durch Reaktion mit einem Energieträger aus der Umgebung. Eine Eintreffer-Reaktion ist die Änderung eines Enzymmoleküls in den Zellen durch ein einziges Elementarereignis, das für das Auftreten des untersuchten Effekts genügt. Das Wirkvolumen ist dann die Summe aus dem Volumen des Enzymmoleküls oder dem Unterbereich desselben und einer das Molekül umgebenden, wirksamen Zone, aus der durch Bestrahlung gebildete Energieträger zum Molekül diffundieren können. Da die Energiedepots zeitlich und räumlich diskontinuierlich verteilt sind, finden in einem Enzymmolekül, abgesehen von der indirekten Strahlenwirkung, bei Röntgenbestrahlung eine oder mehrere Ionisationen statt. Im Mittel liegen drei Ionisationen sehr nahe beieinander, wie C.T.R.WILSON (120) gefunden hat, und somit werden etwa 110eV bei einem Enzymmolekül umgesetzt. Dieses hohe Energiedepot führt zu chemischen Veränderungen und mit großer Wahrscheinlichkeit zur Inaktivierung des Enzymmoleküls. Obwohl in einem Enzymmolekül mehr als 100 Aminosäuren enthalten sind, ist die katalysatorische Fähigkeit des Enzyms von einer kleinen Anzahl der Aminosäuren

auf der Oberfläche des Enzymmoleküls abhängig (11). Die für die katalysatorische Funktion verantwortlichen Aminosäuren sind mit der Sekundär- und Tertiär-Struktur des Moleküls verbunden. Daher wird bei Bestrahlung das Enzym entweder durch chemische Veränderung einer Aminosäure-Seitenkette an der kritischen Stelle oder durch Spaltung der primären Struktur des Moleküls inaktiviert.

RAJEWSY nimmt an (89,92), daß die deponierte Strahlenergie im Molekül wandern und dann an einer kritischen Stelle selektiv wirksam werden kann. Dies wurde auch experimentell gezeigt (112). Dabei wird die Energie bevorzugt an Kovalenz-Bindungen absorbiert. Ferner haben ALEXANDER und CHARLESBY (1,2) gezeigt, daß die Energie in eine C-C-Kette nicht weiter als etwa 12 C-Atome wandern kann. Viele Autoren (SETLOW (101,103,104), AUGENSTINE (7,8), GORDY et al (42,43), ALEXANDER und HAMILTON (4), RAY et al (122) u.s.w.) untersuchten die Aufspaltung der chemischen Bindungen bei der Bestrahlung mit der Mikrowellen-Spektroskopie (42,43), der Papierelektrophorese (122) und über die Veränderung des UV Absorptionsspektrums (101,103,104,4). Diese Versuche legen die Annahme nahe, daß die S-S-Bindung die schwache und deshalb empfindliche kritische Stelle ist, die für die Enzymaktivität wesentlich ist. Daher vermutet man, daß die Inaktivierung durch folgende Prozesse zustande kommt :

Die im Elementarereignis deponierte Energie wandert die Kette kovalenter Bindungen entlang bis zur kritischen Stelle, z.B. einer S-S-Bindung, und spaltet dort die Bindung auf. Dadurch wird die Inaktivierung eines Enzyms hervorgerufen.

PLATZMAN und FRANK (81) zeigten noch einen anderen Inaktivierungsprozeß. Eine Umordnung der polaren Gruppen im Molekül, die durch das plötzliche Auftreten einer elektrischen Ladung (Ionisation) entsteht, verursacht gleichzeitig die Aufspaltung mehrerer schwacher polarer Bindungen, z.B. der H-Bindungen. Als Folge davon wird die Sekundär-

struktur des Moleküls zerbrochen. HUTCHINSON (60) weist jedoch darauf hin, daß das Wirkvolumen unabhängig von der Strahlenart konstant bleibt. Dies zeigt, daß der Inaktivierungsprozeß durch die Aufspaltung der H-Bindung durch Polarisierung nicht wichtig ist. Wenn dieser Prozeß ein wichtiger Inaktivierungsmechanismus wäre, hätte man ein vergrößertes Wirkvolumen bei dichter ionisierenden Strahlen zu erwarten. Die Wahrscheinlichkeit für die Spaltung der H-Bindung ist in diesem Falle größer.

Nun erhebt sich die Frage nach der Wirksamkeit dieser Prozesse. Der Energieaufwand bei der Aufspaltung der S-S-Bindung und der H-Bindung beträgt nur 1 eV bzw. 0,2 eV (8,11). Es müßte daher schon eine Absorption von z.B. 4 - 5 eV Energie zur Inaktivierung des Enzymmoleküls genügen. HUTCHINSON (53) zeigt, daß die Wahrscheinlichkeit für eine Inaktivierung eines Eiweißmoleküls durch die Absorption von 2,2 eV Energie sehr klein ist, während sie bei Absorption von 10-12 eV Energie erheblich größer wird. Diese Energie liegt in der gleichen Größenordnung, wie der mittlere Energieaufwand für die Erzeugung eines Ionenpaares in Luft von 34 eV (117).

In einem Makromolekül, das ein Molekulargewicht von etwa 100 000 besitzt, gibt es etwa 10 000 chemische Bindungen. Die Zahl der für die Enzymaktivität kritischen Bindungen ist jedoch erheblich kleiner. Da, wie oben erwähnt, eine Energiewanderung der absorbierten Strahlenenergie im Makromolekül angenommen werden kann und der bei einem Elementarereignis irgendwo im Makromolekül deponierte Energiebetrag von etwa 100 eV groß gegenüber der Bindungsenergie^{der} als kritisch angenommenen S-S- oder H-Bindung ist, dürfte ein Elementarereignis pro Proteinmolekül zur Inaktivierung ausreichen. So ist nach POLLARD (84) die Wahrscheinlichkeit für die Inaktivierung eines Enzymmoleküls durch die Deponierung von 100 eV an beliebiger Stelle im Molekül von der Größenordnung 1. Bei einigen speziellen Proteinen

liegen experimentelle Hinweise vor, daß die Deponierung eines Energiebetrags von 30 eV zur Inaktivierung nicht ausreicht (60). Es ist ein Mindestenergiebetrag von 100 eV notwendig. Aber auch in diesem Falle erhielt man eine exponentielle Dosis-effekt-Kurve. Auf Grund der erwähnten experimentellen Befunde und Überlegungen über den Inaktivierungsmechanismus im bestrahlten Enzymmolekül, stellt man sich heute vor, daß eine einzige Ionisation, oder besser ein Ionenhäufchen in einem Enzymmolekül die katalysatorische Enzymaktivität vernichten kann. Ein einziges Elementarereignis im Molekül genügt also, um das Enzym zu inaktivieren. Daher sind die Inaktivierungsereignisse und deren Folgeprozesse Eintreffer-Reaktionen.

Es ist verständlich, daß die Strahlenempfindlichkeit des Enzymmoleküls durch das innere Milieu der Zellen beeinflußt wird. Im folgenden soll eine kurze Betrachtung über die Wahrscheinlichkeit der Inaktivierung eines Enzymmoleküls bei Bestrahlung in der Zelle angestellt werden. Es werde angenommen, daß die Deponierung eines eng lokalisierten Energiebetrages von 100 eV im Eiweißmolekül dieses inaktiviert. Das Volumen eines LDH-Moleküls mit einem Molekulargewicht von 120 000 beträgt $1,6 \cdot 10^{-19} \text{ cm}^3$. Die der experimentell bestimmten Inaktivierungsdosis von $3,5 \cdot 10^6 \text{ r}$ entsprechende Zahl der Elementarereignisse (von je 100 eV Energieaufwand) pro Molekül errechnet sich zu 0,3 (s. Anhang S. 53). Da die Wahrscheinlichkeit für die Deponierung des einen Energiedepots im Molekül bei Bestrahlung mit der Inaktivierungsdosis per definitionem gleich 1 ist, müssen in der Zelle noch zusätzliche Inaktivierungsmechanismen vorhanden sein. Diesen zusätzlichen Inaktivierungsmechanismus beschreibt man nach RAJEWSKY (86) durch den sog. indirekten "chemischen Treffer".

Wenn die Enzymmoleküle in kristallinem oder in getrocknetem Zustand bestrahlt worden wären, wäre nur ein Effekt durch direkte Strahlen-

wirkung zu erwarten. Bei der Inaktivierung der Enzyme in Zellen darf man jedoch einen Effekt durch die diffusionsfähigen Energieträger aus der Umgebung erwarten. Da das Volumen der Proteine in der Zelle kleiner ist, als das Volumen des Zellwassers, ist auch die Wahrscheinlichkeit einer Ionisation oder Anregung in den Enzymmolekülen selbst kleiner, verglichen mit der Wahrscheinlichkeit einer Ionisation oder Anregung in der wässrigen Lösung. Die beiden Wahrscheinlichkeiten verhalten sich dabei in erster Näherung wie ihre Volumenanteile.

Die Inaktivierung der Enzyme in verdünnter wässriger Lösung durch γ - und Röntgen-Strahlen wurde schon in den Arbeiten von HUSSEY und THOMPSON (1923,(52)) und NORTHROP et al (1926,(24)) beschrieben. Es wurde zuerst durch die Arbeit von DALE im Jahre 1940 (29) klar, daß die Inaktivierung der Enzyme in wässriger Lösung durch Röntgenstrahlen zum Teil von diffusionsfähigen Energieträgern verursacht werden kann. 1927 hatte FRICKE (38) schon darauf hingewiesen, daß bestrahltes Wasser eine chemische Wirkung verursachen kann. Die Theorie der freien Radikale oder die "active solvent hypothesis" wurde zuerst durch die Arbeit von RISSE (95) eingeführt und danach von FRICKE (39) und WEISS (116) weiter entwickelt. Verschiedene Enzyme wurden untersucht; besonders durch DALE (29-33), BARRON (13,14), RAJEWSKY, GERBER und PAULY (74,75,77,78,91,93), HUTCHINSON et al (55,58,61,64) und AUGENSTINE (9,11). Trotz aller Bemühung wissen wir noch nicht genau, was eigentlich die Energieträger sind, wieviel Energieträger gebildet werden und wie aktiv diese sein können. Deshalb ist eine theoretische Analyse der indirekten Strahlenwirkung in der Zelle besonders erschwert. Als erste Näherung nehmen wir an, daß die primären diffusionsfähigen Energieträger in der Zelle denen im Wasser gleich sind. Wenn man den Wassergehalt der Aszites-Tumorzellen zu 83,5 % annimmt (der Trockenanteil von EAT-Zellen beträgt 16,5 %), ergibt sich in einer EAT-Zelle

vom Durchmesser 16μ ein Wasservolumen von etwa $1,8 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^3$. Einer Dosis von $3,5 \cdot 10^6$ r entsprechen in diesem Volumen etwa $6,01 \cdot 10^{11} \cdot 3,5 \cdot 10^6 \cdot 1,8 \cdot 10^{-9} = 3,9 \cdot 10^9$ Elementarereignisse von je 100 eV Energieaufwand (Berechnung analog Anhang S. 53). Die dadurch erzeugten Energieträger im wässrigen Medium der Zelle verteilen sich statistisch zwischen den vorhandenen Makromolekülen. Da die vorhandenen Elektrolyte relativ wenig Energieträger abfangen, können sie in den folgenden Berechnungen vernachlässigt werden. Durch Zusammenstoß mit einem Makromolekül ergibt sich eine Veränderung des Makromoleküls, die mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit zur Inaktivierung des Enzymmoleküls führt. Mit der Annahme, daß die Energieträger im wässrigen Medium statistisch verteilt sind und daß sie gleichmäßig mit der gesamten Oberfläche des Makromoleküls reagieren und dieses inaktivieren, kann man die Wirksamkeit dieses Inaktivierungs-Mechanismus' abschätzen. Nimmt man für die Eiweißmoleküle ein mittleres Molekulargewicht von 100 000 und für die Kohlehydrat- und Fett-Moleküle ein Molekulargewicht von 700 an, dann ergibt sich bei kugelförmigen Molekülen eine Oberfläche von $1,2 \cdot 10^{-12} \text{ cm}^2$ ^{*)}, beziehungsweise $5,0 \cdot 10^{-14} \text{ cm}^2$ ^{*)}. Nimmt man weiter an, daß ein Nukleinsäuremolekül eine Länge von $2300 \text{ \AA}$ und einen Durchmesser von $23 \text{ \AA}$ hat, dann ergibt sich eine Oberfläche pro Molekül von etwa $1,7 \cdot 10^{-11} \text{ cm}^2$ ^{*)}. In einer kugelförmigen Zelle mit dem Radius 8μ erhält man als Oberflächen: für das Eiweiß $2,6 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2$ ^{*)}, für die Kohlenhydrate und Fett $3,1 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2$ ^{*)} und für die Nukleinsäuren $3,9 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2$ ^{*)}, wenn man den Anteil des Eiweißes, der Kohlenhydrate und Fette und der Nukleinsäure in den Aszites-Tumorzellen zu 12 %, 3 % bzw. 1 % annimmt. Dividiert man die Zahl Elementarereignisse für $3,5 \cdot 10^6$ r im wässrigen Medium von $3,9 \cdot 10^9$ durch die gesamte Oberfläche der Makromoleküle und multipliziert mit der Ober-

^{*)}: Berechnung s. Anhang S. 54

fläche der Eiweißmoleküle, dann erhält man ein Maß für die den Eiweißmolekülen zur Verfügung stehenden diffusiblen Energieträger, die bei der der Strahlendosis entsprechenden Zahl von Elementarereignissen im Zellmilieu gebildet werden. Es stehen demnach $1,6 \cdot 10^9$ *) Energiebeträgen von 100 eV etwa $2,1 \cdot 10^9$ Eiweißmoleküle gegenüber. Bei einem G-Wert von 0,5 wäre demnach schon ein erheblicher Anteil aller Eiweißmoleküle inaktiviert. Aus dieser Näherungsrechnung ersieht man, daß der indirekte Treffer in der Zelle eine erhebliche Rolle spielen muß.

Abhängigkeit der Strahlenwirkung von Milieufaktoren und von der Strahlenqualität

Der große Beitrag der indirekten Treffer zur Strahlenwirkung auf Enzyme in der Zelle erklärt die Abhängigkeit der Strahlenempfindlichkeit vom Wassergehalt der Zelle; darüberhinaus hat aber auch der jeweilige physiologische Zustand des Enzyms Einfluß auf dessen Strahlenempfindlichkeit. Temperatur, Gasgehalt bei der Bestrahlung und im wässrigen Medium vorhandene kleine Moleküle sind einige Faktoren, die die Strahlenempfindlichkeit von Enzymmolekülen modifizieren.

Außer dem Wasser sind in der Zelle verschiedene Makro- und Mikromoleküle vorhanden. Diese Moleküle beeinflussen die Strahlenempfindlichkeit der Enzymmoleküle nicht nur durch den Zusammenstoß mit den Energieträgern und damit deren Löschung, sondern auch durch die direkte Einwirkung. Diese Effekte durch die kleinen Moleküle zeigen sich nicht nur im wässrigen Medium, sondern auch in getrockneten Enzymen. Es wurde gezeigt (94,18), daß die Strahlenempfindlichkeit des Enzymmoleküls durch das umgebende Medium entweder vergrößert, oder verklein-

*) : Berechnung s. Anhang S. 55

niert wird. Es wurden trockene Enzyme aus Lösungen gewonnen; sie enthielten verschiedene kleinere Moleküle, wie Cystein, Glutathion, Essigsäure, Saccharose und Natriumchlorid, oder auch Ribonukleinsäure. Befand sich das Enzym vor der Trocknung in SH-haltigen Lösungen, z.B. mit Cystein, Glutathion, so wird die Inaktivierungsdosis verdoppelt gegenüber Lösungen ohne SH-haltige Gruppen (18,60). Dagegen wird das Enzym empfindlicher, wenn es sich vorher in einer Laktose-haltigen Lösung befand (19). Diese Einwirkung der kleinen Moleküle auf die Strahlenempfindlichkeit des Enzyms kann man interpretieren, wenn man eine Wechselwirkung zwischen den Molekülen annimmt. Tatsächlich wurde geklärt, daß eine Energieübertragung zwischen den Molekülen stattfindet (1,102,72). Deshalb kann man vermuten, daß Energie, die in den kleinen Molekülen absorbiert wird, unter Umständen zum benachbarten Enzymmolekül wandert und dort eine Inaktivierung verursacht. Andererseits füllt sich ein Elektronen-"Loch", das durch die Energieabnahme von einem Enzymmolekül verursacht wurde, durch eine Elektronenübertragung von einem benachbarten kleinen Molekül wieder auf.

Die Strahlenempfindlichkeit hängt auch von der Art der Pufferlösung, von der Wasserstoffionen-Konzentration des Mediums (6,20,119,71,96), vom am Molekül gebundenen Wasser ab (109).

Die Enzymmoleküle wurden bei dem oben beschriebenen eigenen Versuch bei 4° C bestrahlt. Im allgemeinen wird bei hoher Temperatur die Strahlenempfindlichkeit des Enzyms vergrößert, wie es zum Beispiel bei Invertase (83), Katalase (99) und Trypsin (19) der Fall ist.

Der Gasgehalt des Mediums beeinflußt ebenfalls den biologischen Strahleneffekt. So erhöht sich bei zahlreichen Experimenten mit steigendem Sauerstoffgehalt des Mediums die Strahlenempfindlichkeit (12). Dieser

Effekt wird dadurch gedeutet, daß die im Wasser bei der Bestrahlung gebildeten freien Radikale durch die O_2 -Moleküle stabilisiert werden : Die Rekombination der Radikale wird geringer, somit die Zahl der die empfindlichen Moleküle erreichenden diffusiblen Energieträger höher und damit auch die Zahl der inaktivierten Moleküle (12). Es liegen aber auch zahlreiche Ergebnisse vor, bei denen die Strahlenempfindlichkeit in verdünnten wässrigen Lösungen von der Sauerstoffkonzentration unabhängig ist, wie bei Ribonuklease (47), Ferricytochrom c (14), Chymotrypsin (70), Trypsin (69) und Katalase (108). Nur für die Desoxyribonuklease wurde die Erhöhung der Strahlenempfindlichkeit festgestellt (71). Bei Trypsin gibt es widersprechende Ergebnisse : die Strahlenempfindlichkeit wird bei Anwesenheit von Sauerstoff niedriger (21,22).

Von zahlreichen Autoren wird ein Sauerstoffeffekt auch bei Bestrahlung im trockenen Zustand beschrieben : die Strahlenempfindlichkeit der Enzyme stieg dabei bei Anwesenheit von Sauerstoff um den Faktor 2 - 3 (3,19,51,72,63). Bei einigen Versuchen mit Trypsin und Chymotrypsin ergibt sich der Sauerstoffeffekt nur bei Bestrahlung mit hohen Dosisleistungen (21-23). Der Sauerstoffeffekt ist aber geringer, wenn man mit dicht ionisierenden Strahlen (z.B. α -Teilchen) bestrahlt (3,23,60). Diese Tatsache wurde so erklärt, daß der Sauerstoff in der Nähe der Bahnspur der Strahlen lokal verbraucht wird.

Der Gasgehalt der Inkubationslösung nach der Bestrahlung kann die Strahlenempfindlichkeit ebenso beeinflussen, wie der Gasgehalt des Mediums während der Bestrahlung. HUNT et al (51) haben den Sauerstoff-Nachbestrahlungseffekt mit der Vorstellung der freien Radikale gedeutet. Bei der Bestrahlung entstehen stabile, freie Radikale durch Abspaltung eines H-Atoms. Diese bilden nach der Bestrahlung in Anwesenheit von Sauerstoff weitere freie Radikale. Die Tatsache, daß

der Sauerstoffeffekt nach der Bestrahlung kleiner als der Sauerstoffeffekt während der Bestrahlung ist, bedeutet, daß einige instabile Radikale schon vor der Sauerstoff-Zufuhr verschwunden sind. Die Gegenwart von Stickoxyd (NO) während der Bestrahlung zeigt qualitativ die gleichen Effekte auf die Strahlenempfindlichkeit, wie der Sauerstoff (49,50); die beobachteten Erhöhungen oder Erniedrigungen der Strahlenempfindlichkeit sind jedoch nicht so groß (63). In der vorliegenden Arbeit wurden die Enzyme unter Stickstoff bestrahlt. Deshalb kann der Sauerstoffeffekt ausgeschlossen werden.

Die Strahlenempfindlichkeit von Enzymmolekülen ist auch durch die Art der Strahlen, durch die Dosisleistung und durch die Behandlungsart nach der Bestrahlung bedingt. Die Gründe für den Einfluß der Behandlungsart nach der Bestrahlung liegen darin, daß die Enzyme durch Bestrahlung zum Teil geschädigt sind und sich je nach der Behandlung entweder "erholen" oder inaktiv werden (10,6).

Es wurde in der vorliegenden Diskussion gezeigt, daß die Strahlenempfindlichkeit des Enzyms von vielen Versuchsbedingungen abhängt. Die funktionelle Einheit der Zelle und die physikalische Umgebung bei der Bestrahlung beeinflussen die Strahlenempfindlichkeit von Enzymen. Daher ist die Inaktivierungsdosis, die in der vorliegenden Arbeit bestimmt wurde, kein absolutes Maß für die Strahlenempfindlichkeit des Moleküls selbst, sondern ein relatives Maß für das Verhalten der Enzyme in ihrer Umgebung.

Über das Diffusionsmodell und den Diffusionsbereich in der Zelle

Die indirekte biologische Strahlenwirkung schließt das Elementarereignis ein, das innerhalb eines bestimmten Bereiches um das empfindliche Molekül in der Flüssigkeit stattfindet. Der Abstand hängt dabei von der Diffusionsgeschwindigkeit, von der mittleren Lebensdauer und von der Art der Energieträger (aktive Radikale), die durch die Strahlung gebildet werden, und auch von der intra- und inter-molekularen Energieübertragung ab. Die Lebenszeit der ionisierten und angeregten Wassermoleküle bis zu ihrem Zerfall zu Radikalen ist sehr kurz ($< 10^{-11}$ sec.). Deshalb wird die indirekte Wirkung in wässrigen Systemen nicht von den ionisierten oder angeregten Wassermolekülen verursacht, sondern von ihren intermediären Produkten, die mehr oder weniger stabil sind. Diese durch Bestrahlung gebildeten intermediären Produkte (OH , H , HO_2 , H_2O_2 u.s.w.) wandern durch das Medium, bis sie auf für eine Reaktion geeignete Moleküle stoßen. Die mittlere Lebensdauer der intermediären Produkte beträgt dabei etwa 10^{-9} bis 10^{-5} Sekunden. Aus diesem Grund wurde der Reaktionsmechanismus des Diffusionsmodells in der Zelle eingeführt durch die Arbeiten von RAJEWSKY (89) und SIX (105), PAULY (75), WIJSMAN (118), TOBIAS (111), ZIRKLE und TOBIAS (121) und HUTCHINSON (54,56). Der Formalismus des Diffusionsmodells ist jedoch kaum anwendbar für die experimentelle Prüfung dieses Modells, da in der Formel eine große Zahl von komplizierten Parametern enthalten ist. Durch sorgfältige Prüfung und Vereinfachung der Formel, die besonders von SIX (105), ZIRKLE und TOBIAS (121) entwickelt ist, wurde von HUTCHINSON (56) zuerst eine Näherungsgleichung eingeführt. Diese Formel wurde in einigen Experimenten angewendet, um dadurch das Verhalten der direkten und indirekten biologischen Strah-

lenwirkung in den Zellen quantitativ klar darzulegen.

Die Wirkung der umgebenden diffusionsfähigen Produkte bei der indirekten Strahlenwirkung wird in der Formel (56,80) durch die mittlere Reichweite des Energieträgers dargestellt. Die Formel lautet :

$$\frac{N}{N_0} = e^{-\left[\int_{di} \cdot \mathcal{L}'_{di} + \int_{in} Y \cdot 4\pi R^2 \left(1 + \frac{Y}{R} \right) q \right] D} \quad (9)$$

Dabei bedeuten alle Bezeichnungen das gleiche, wie vorher (s. S. 31 u. 25)

Wie man aus der Gleichung(9)sieht, hängt die indirekte Strahlenwirkung von dem mittleren Diffusionsweg $\mathcal{Y}$, der Konstanten q und der Ausbeute Y ab.

Die Konstante q ist ein Maß dafür, ob die Reaktionsgeschwindigkeit zwischen Energieträger und empfindlichem Molekül durch die Diffusion oder durch die Reaktionsgeschwindigkeit an der Oberfläche des empfindlichen Moleküls bedingt ist. Also ist q ein Faktor, der von der Wahrscheinlichkeit der Reaktion zwischen den Radikalen und dem Enzymmolekül abhängt.

Im allgemeinen ist Eiweiß, speziell ein Enzym, ein sehr empfindlicher Akzeptor für die Wasser-Radikale, die selbst sehr reaktionsfähig sind. Deshalb darf man erwarten, daß alle Radikale, die mit der Moleküloberfläche in Berührung kommen, reagieren. D.h. die Reaktion an der Oberfläche der Enzymmoleküle wird bei jedem Stoß erfolgen (57). Dann wird q nach Definition 1. In der vorliegenden Abschätzung wurde der Wert für q gleich 1 gesetzt. Einen unteren Wert für q erhält man durch einen von HUTCHINSON (56) durchgeführten Vergleich mit der Reaktionswahrscheinlichkeit in organischen Dämpfen. Wenn q an der unteren Grenze liegt, ist die Reaktionsgeschwindigkeit vorwiegend durch die chemische Reaktionsgeschwindigkeit an der Oberfläche bedingt. Wenn aber q gleich 1 ist, reagieren die Radikale schnell mit der Oberfläche

der Enzymmoleküle. Daher wird die Reaktion durch die Diffusion limitiert. Für viele biologische Moleküle liegen die Werte von q nach HUTCHINSON (56,62) zwischen 0,25 und 1.

Die Ausbeute Y in der Formel bedeutet die Zahl der umgewandelten Moleküle pro 100 eV absorbiertener Strahlenenergie. Es wird vorausgesetzt, daß keine Radikale durch Konkurrenzreaktionen verlorengehen. Nach Definition ist $Y = G \cdot P$, wobei G die Zahl der erzeugten reaktionsfähigen Radikale pro 100 eV und P die Wahrscheinlichkeit, daß ein in der Umgebung gebildetes und herausdiffundiertes Radikal auch mit dem empfindlichen Molekül reagiert.

Die Ausbeute für die Erzeugung der verschiedenen Radikale hängt von der Wasserstoffionen-Konzentration, vom Gasgehalt der Flüssigkeit, von der Strahlenart und von anderen Versuchsbedingungen ab (80).

Ebenso hängt die Wahrscheinlichkeit P für die Reaktion eines gelösten Moleküls pro gelöschtem Radikal von den Versuchsbedingungen ab. Der Wert Y hängt auch von der Art inaktivierter Moleküle ab, weshalb er für die verschiedenen Enzymmoleküle stark variiert. Die G -Werte für die Inaktivierung von Enzymmolekülen liegen nach Angaben vieler Autoren zwischen 0,01 und 3. Nach BARRON (14) liegen die Werte in sehr vielen Fällen unter 1. Im Anhang wurde die Tabelle für die Y -Werte (bzw. G -Werte) nach PAULY (80) und HUTCHINSON (59) für die Inaktivierung von Enzymen und anderen Proteinen in verdünnten Lösungen dargestellt. Die Ausbeute Y charakterisiert die Strahlenempfindlichkeit des Enzymmoleküls.

Die mit verschiedenen Y -Werten zwischen 0,1 und 3 berechneten Werte für den mittleren Diffusionsweg (s. Gleichung 8, S. 29 und Tab. 4, S. liegen dabei zwischen 6 Å und 80 Å. Die großen Schwankungen sind dadurch verursacht, daß für den Y -Wert Werte in dem Bereich von 0,1 bis

eingesetzt werden. Mit den oben genannten Werten von Y und q erhält man aus den obigen eigenen Ergebnissen eine freie Diffusionslänge von 10 bis 100 Å. Sie stimmt in der Größenordnung mit den früheren Arbeiten von RAJEWSKY und PAULY (93) überein. Die indirekte Strahlenwirkung in der Zelle ist also auf einen verhältnismäßig kleinen Bereich lokalisiert und der Diffusionsbereich, wie HUTCHINSON (56) schon gezeigt hat, trotz der verschiedenen Volumina der Enzymmoleküle relativ gut konstant. Man darf jedoch erwarten, daß das mit dem Ort des Enzymmoleküls in der Zelle variieren wird. Die Ergebnisse von Messungen der elektrischen Leitfähigkeit des Zytoplasmas (80) zeigen aber näherungsweise die gleiche elektrische Leitfähigkeit, wie eine Proteinlösung in einem Elektrolyt entsprechender Zusammensetzung. Die Messungen zeigen daher, daß die Diffusion kleiner Moleküle in der Zelle nicht so stark behindert ist, wie man es auf Grund der elektronenmikroskopisch sichtbaren Struktur vermuten würde.

φ ist nach der Definition durch die mittlere Lebensdauer der Radikale und den Diffusionskoeffizienten bestimmt, unabhängig von der Größe der geschädigten Enzymmoleküle. Für die Diffusion des schweren Wassers ist der Diffusionskoeffizient etwa $2,0 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sec}$. Daher bekommt die mittlere Lebensdauer der Radikale etwa die Größenordnung 10^{-9} Sekunden, wenn man als mittleren Diffusionsweg etwa 30 Å annimmt (56). Ein oberer Grenzwert für das φ würde sich bei 100 bis 300 Å ergeben, wenn man für den unteren Grenzwert von q etwa die Größenordnung 10^{-2} annimmt. φ hängt jedoch nicht sehr stark von q ab. Der kleine Wert von φ ist von der Annahme abhängig, daß die Radikale in kurzer Zeit (10^{-9} sec .) mit der Oberfläche eines Enzymmoleküls reagieren. Wenn das nicht der Fall ist, d.h. die Konstante q kleiner als 1 ist, so wird φ einen größeren Wert annehmen.

Um den Wert von γ mit der mittleren Dicke der Wasserschicht an den Makromolekülen bei den EAT-Zellen vergleichen zu können, wurde folgende grobe Abschätzung durchgeführt. Wie auf S. 40 wird angenommen, Die EAT-Zelle sei kugelförmig, mit einem Radius von 8μ . Ihre stoffliche Zusammensetzung sei folgende:

12 % Proteine, mittleres Molekulargewicht 100 000, kugelförmige Moleküle, Dichte $\approx 1,3$; 3 % Fette und Kohlehydrate, mittleres Molekulargewicht 700, kugelförmige Moleküle, Dichte $\approx 1,1$; 1 % Nukleinsäure, Zylinder der Länge 2 300 Å, Durchmesser 23 Å, Dichte ≈ 1 ; 0,5 % kleine Moleküle; 83,5 % Wasser.

Wenn man weiter annimmt, daß das Wasser in den Zellen gleichmäßig über den ganzen Bereich der Zellen verteilt ist, so ergibt sich nach einfacher Berechnung nach HUTCHINSON (56), daß die mittlere Dicke des Wassers an der gesamten Oberfläche der Makromoleküle etwa 30 Å beträgt *). Das stimmt mit dem in vorliegender Arbeit ermittelten Wert von γ hinreichend gut überein. Es zeigt sich eine statistische Verteilung der Makromoleküle und der Radikale, die in den Wasserschichten gebildet werden, an die Oberfläche des Makromoleküls diffundieren und dort reagieren. Dieser Diffusionsweg in der Zelle ist wesentlich kleiner, als der Diffusionsweg der Radikale in reinem Wasser (107). Die kurze Diffusionsstrecke in der Zelle von etwa 10-100 Å hat ihre Ursache in der Tatsache, daß die Konzentration der Makromoleküle außerordentlich hoch ist.

Den oben durchgeführten Abschätzungen des Diffusionsbereiches bei der indirekten Strahlenwirkung liegt ein einfaches Modell zugrunde. Das Modell führt als Näherung die komplizierteren Vorgänge bei der Bestrahlung auf einfachere Parameter zurück. Auf Grund dieses Modells

*) : Berechnung s. Anhang S. 56

wird eine einfache mathematische Behandlung der physikalisch-chemisch bedingten Vorgänge ermöglicht. Deshalb stellt der Modellversuch keinesfalls ein vollständiges Bild der wirklich ablaufenden Prozesse dar. Es besteht die Möglichkeit, daß man auf Befunde stößt, die mit den aus dem Modell gezogenen Folgerungen nicht übereinstimmen. Viele Autoren (ALEXANDER (3), DALE (34), ALFER (5)) haben darauf hingewiesen, daß die Bestimmung eines treffertheoretischen Molekulargewichtes (s.S. 32), sowie des mittleren Diffusionsweges unrealistisch sei, da die vorausgesetzten Parameter hinsichtlich der komplizierten biologischen Systeme unsichere Näherungen sind. Jedoch geben die Modellversuche ein nützliches Bild für die wahrscheinlichen Mechanismen des Vorganges in der lebenden Zelle bei der Bestrahlung. Wie schon erwähnt wurde, bestehen bei dem Modell viele Näherungen. Das Modell hat daher viele Elemente, die es unter Umständen modifizieren können.

V. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden die Ergebnisse der Untersuchungen über die direkte und indirekte biologische Röntgenstrahlenwirkung auf Enzyme von Maus-Ehrlich-Aszites-Tumorzellen mitgeteilt. Die Enzyme wurden in vivo bestrahlt und die Dosiseffekt-Kurven aufgenommen. Es wurde die Strahleninaktivierungsdosis für eine Reihe von Enzymen aus dem Kohlenhydratstoffwechsel untersucht, und zwar : Lactatdehydrogenase, Aldolase, Glycerophosphatdehydrogenase, Phosphoglyceratkinase aus der EMBDEN-MEYERHOFschen Glykolyse, Äpfelsäuredehydrogenase und Glutaminsäuredehydrogenase aus dem Citronensäurecyclus und dessen Nebenkette und Glukose-6-Phosphatdehydrogenase aus dem Pentosephosphatcyclus.

Die Bestrahlung wurde mit der Hochleistungsröntgenröhre II nach RAJEWSKY und HEUSE bei 65 kV, 1 A, einer Dosisleistung von 580 kr/min. in 12 mm Abstand, bei Stickstoff-Atmosphäre und 4°C durchgeführt. Die Dosisleistung wurde mit einer Parallelplatten-Kammer gemessen. Die Aktivität der Enzyme wurde mit der photometrischen Methode bestimmt. Die experimentell bestimmten Dosiseffekt-Kurven sind exponentiell. Die Meßgenauigkeit war etwa 5 %. Im allgemeinen liegt die Inaktivierungsdosis etwa in der Größenordnung von einigen 10^6 r, genauer zwischen 3 und 7 Mr. Diese hohe Strahlenresistenz der Enzyme im Protoplasma zeigt somit, daß der Tod eines Säugetieres nach einer Ganzkörperbestrahlung mit einigen 100 r nicht durch primäre Strahlenwirkung auf die Enzymmoleküle verursacht sein kann. Wenn nach einer Ganzkörperbestrahlung mit 100 -1000 r im Verlauf der Strahlenkrankheit Veränderungen der Enzymaktivität in den verschiedenen Zellen und Geweben gefunden werden, so muß es sich um sekundäre Folgeprozesse handeln. Mit der Treffertheorie und dem Diffusionsmodell wurde der

mittlere Diffusionsweg der Energieträger in der Zelle für die Enzyme Lactatdehydrogenase, Äpfelsäuredehydrogenase, Aldolase, Glycerophosphatdehydrogenase, Phosphoglyceraldehyddehydrogenase Phosphoglyceratkinase berechnet. Dabei ergaben sich die Werte von 10 - 100 Å. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen wurden die elementaren Mechanismen der Strahlenwirkung von Enzymen in der Zelle diskutiert. Dabei wurde festgestellt, daß bei der Inaktivierung der Enzymmoleküle durch Bestrahlung die indirekte Strahlenwirkung eine große Rolle spielen muß.

Anhang (1) : Zur Berechnung der Zahl der Elementarereignisse
pro Molekül (s. S. 38)

Die Definition des Röntgen (r) lautet : "Das Röntgen (r) sei eine solche Menge einer Röntgen- oder Gammastrahlung, daß die damit verbundene Korpuskularemission pro 0,001293 g Luft Ionen in Luft erzeugt, die eine elektrostatische Einheit der Elektrizitätsmenge beiderlei Vorzeichens tragen."

Demzufolge erhält man die Energieabsorption pro g Gewebe bei Einstrahlung einer Dosis D in r :

$$E_a = \frac{D \cdot W}{e \cdot m} \left(\frac{Z_{\text{gewebe}}}{Z_{\text{luft}}} \right)$$

Dabei bedeutet :

E_a = absorbierte Energie pro g in (eV/g)

D = Dosis in (r)

W = Energieverbrauch bei Erzeugung eines Ionenpaares in Luft;

(= 34,0 eV)

e = Elementarladung; (= $4,80 \cdot 10^{-10}$ ese)

m = Gewicht von 1 cm³ Luft bei 760 mmHg und 0°C; (= 0,001293 g)

Z = effektive Elektronenzahl pro g

Das Verhältnis der Elektronenzahlen pro g von Gewebe ($\approx$ Wasser) zu Luft beträgt 1,11.

1 r entspricht somit einer Energieabsorption von $\frac{1 \cdot 34}{4,80 \cdot 10^{-10} \cdot 0,001293} = 6,01 \cdot 10^{13}$ eV pro g Gewebe.

Demnach ergibt sich die der experimentell bestimmten Inaktivierungsdosis von $3,5 \cdot 10^6$ r entsprechende Zahl X der Elementarereignisse pro Molekül des Volumens $1,6 \cdot 10^{-19}$ cm³ (entspricht einem kugelförmigen Molekül des Molekulargewichts 120 000) :

$$X = 6,01 \cdot 10^{13} \cdot 3,5 \cdot 10^6 \cdot 1,6 \cdot 10^{-19} \cdot 10^{-2} = 0,3$$

Anhang (2) : Zur Abschätzung des Anteils der indirekten Strahlenwirkung auf die Proteinmoleküle in der Zelle (s. S. 40 u. 41)

Zur Berechnung werden folgende Annahmen gemacht :

Die Zellen seien Kugeln mit dem Radius 8μ .

Ihre chemische Zusammensetzung sei folgende :

12 % Protein (kugelförmige Moleküle, mittleres Molekulargewicht

$$M = 100\,000, \text{ Dichte } \rho_p = 1,3)$$

3 % Fette und Kohlenhydrate (kugelförmige Moleküle, mittleres Mole-

$$\text{kulargewicht } M = 700, \text{ Dichte } \rho = 1,1)$$

1 % Nukleinsäure (Zylinder der Länge $l = 2300 \text{ \AA}$, Durchmesser $2R = 23 \text{ \AA}$)

0,5 % kleine Moleküle

83,5 % Wasser

1) Oberflächen der Makromoleküle

Für kugelförmige Moleküle berechnet sich die Oberfläche (O_k) nach der Gleichung :

$$O_k = 4\pi \left(\frac{3}{4\pi} \cdot \frac{1}{\rho} \cdot \frac{M}{N_L} \right)^{2/3}$$

(M = Molekulargewicht; N_L = Loschmidt'sche Zahl ($= 6,03 \cdot 10^{23}$);

ρ = Dichte der Moleküle)

Für zylinderförmige Moleküle berechnet sich die Oberfläche (O_z)

nach der Gleichung :

$$O_z = 2\pi R (l + R)$$

(l = Zylinderlänge der Moleküle; R = Radius des zylinderförmigen Moleküls)

Demnach ergeben sich folgende Moleküloberflächen :

Protein : $O_p = 1,2 \cdot 10^{-12} \text{ cm}^2$

Fette und Kohlenhydrate : $O_k = 5,0 \cdot 10^{-14} \text{ cm}^2$

Nukleinsäure : $O_N = 1,7 \cdot 10^{-11} \text{ cm}^2$

2) Gesamtoberfläche in der Zelle

Die Gesamtoberfläche $\bar{O}$ der einzelnen Molekülsorten in der Zelle bestimmt man nach der Beziehung :

$$\bar{O} = \frac{O \cdot p \cdot V}{\rho \cdot \frac{M}{N_L}} = \frac{4\pi}{3} \cdot R^3 \cdot p \cdot \frac{O}{\rho \cdot \frac{M}{N_L}}$$

(O = Oberfläche des einzelnen Moleküls; V = Volumen der Zelle;

p = Volumenanteil der betreffenden Molekülsorte in der Zelle;

M = Molekulargewicht; N_L = Loschmidt'sche Zahl; ρ = Dichte)

Mit obigen Zahlen erhält man :

Gesamtproteinoberfläche : $\bar{O}_p = 2,6 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2$

Gesamtoberfläche der Fett- und Kohlenhydrate-Moleküle :

$$\bar{O}_F \text{ (bzw. } \bar{O}_K) = 3,1 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2$$

Gesamtoberfläche der Nukleinsäure : $\bar{O}_N = 3,9 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2$

Die Oberfläche der gesamten Makromoleküle in der Zelle beträgt

somit $6,1 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2$ und der Anteil der Proteinmoleküle an der

Gesamtoberfläche : 0,43.

3) Zahl der Elementarereignisse im Zellwasser bei $3,6 \cdot 10^6$ r bezogen auf Anteil der Proteinoberfläche in der Zelle (ξ)

$$\xi = 3,9 \cdot 10^9 \cdot 0,43 = 1,6 \cdot 10^9 \text{ (100 eV)}$$

4) Die Zahl der Proteinmoleküle in der Zelle ergibt sich aus

Gesamtoberfläche der Proteine und der Oberfläche eines

Proteinmoleküls zu $2,1 \cdot 10^9$

5) Berechnung der mittleren Wasserschichtdicke d in der Zelle
(s. S. 49)

Unter der Voraussetzung, daß das Wasser über die gesamte Oberfläche der Makromoleküle in der Zelle gleichmäßig verteilt ist und mit den obigen Annahmen und Ergebnissen errechnet sich d nach :

$$d = \frac{P_w \cdot V}{\overline{O}_M}$$

(P_w = Volumenanteil des Wassers in der Zelle; V = Zellvolumen;

$\overline{O}_M$ = Gesamtoberfläche der Makromoleküle)

Man erhält : $d = 0,30 \cdot 10^{-6} \text{ cm} = 30 \text{ \AA}$.

Anhang - Tab.A : Y-Werte(G-Werte) für die Inaktivierung von Enzymen
und anderen Proteinen in verdünnter Lösung
 (Nach PAULY(80) und HUTCHINSON(59))

Enzym	Y-Wert	Bemerkungen	Literatur
Phosphoglycer- aldehyddehydro- genase	2,9	-----	(13)
Katalase	0,3	-----	(13)
	0,1	-----	(14)
Ribonuklease	0,1	-----	(66)
	1,5	-----	(58)
Karboxypepti- dase	0,5	-----	(32)
d-Aminosäure- oxydase	0,3	-----	(30)
Trypsin	0.77	-----	(13)
"	0,33	NO_2^- - anwesend	(9)
"	0,25	SO_4^{2-} - anwesend	(9)
"	0,13	Cl^- - anwesend	(9)
Lysozym	0,1	-----	(12)
Alkoholdehydro- genase	0,2	-----	(12)
"	0,03	0,1 M Phosphatpuffer, aus (80-1) berechnet	(80-1)
"	0,17	0,1 M Bikarbonatpuffer	(80-1)
"	0,2	-----	(80-2)
"	2,7	-----	(14)
Cytochrom C	0,3	-----	(93)
"	5,2	Reduktion, Ohne O_2	(80-3)
"	2,5	Reduktion, O_2 -gesättigt	(80-3)
Oxyhämoglobin	1,8	Umwandlung in Methämoglobin	(38)
"	0,4	Umwandlung in Methämoglobin	(80-4)
Invertase	0,05	-----	(55)
"	0,15	-----	(59)
Coenzym A	2,7	-----	(58)

Anhang - Tab.B : λ -Werte(mittlerer Diffusionsweg) für die Inaktivierung von Enzymen

Enzym	Zellen	Bestrahlung mit	D_{37}^f .10 ⁶ r	D_{37}^t .10 ⁶ r	λ Å	Literatur
Invertase	Hefe	4 MeV Deuteron	6,2	12	29	(56)
"	"	8 MeV α -Teilch.	5,4	11	33	(56)
"	"	Co ⁶⁰ γ -Strahlen	6	11	29	(56)
Alkoholdehydrogenase (MG. 37 000)	"	4 MeV Deuteron	1,1	28	31	(56)
" (MG. 37 000)	"	Co ⁶⁰ γ -Strahlen	1,5	20	35	(56)
" (MG.150 000)	"	"	1,5	20	18	(56)
" (MG.150 000)	"	"	"	20	14	(56)
Coenzym A	"	4 MeV Deuteron	3	190	29	(56)
"	"	"	3	200	35	(59)
"	E.coli		15	--	17	(59)
"	" peas "		5	--	30	(59)
"	Rind, Herz		100	--	5	(59)
"	Rind, Leber		100	--	5	(59)
Acetylcholinesterase	elektisches Organ des Zitteraals		4,8	4,8	0	(97)
"	Rot-Blut-Körperchen (Menschen)		4,8	4,8	0	(97)
"	Hämoglobin (Ratten)		4,8	4,8	0	(97)
Cytochrom C	MAuseleber		0,8	54	150	(75)

VI. Literaturverzeichnis

- (1) Alexander, P.; Charlesby, A. : Energy transfer in macromolecules exposed to ionizing radiations. *Nature* 173 578-579 (1954)
- (2) Alexander, P.; Charlesby, A. : Physico-chemical methods of against ionizations. *Radiobiology Symposium 1954* (Z.M. Bacq & P. Alexander, eds.) Acad. Press. New York 49-59 (1955)
- (3) Alexander, P. : Effect of oxygen on inactivation of trypsin by the direct action of electrons and α -Particles. *Rad. Res.* 6 653-660 (1957)
- (4) Alexander, P.; Hamilton, L.D.G. : Inactivation of proteins in the solid state III. chemical changes produced in Bovine Serum Albumin. *Rad. Res.* 13 214-233 (1960)
- (5) Alper, T. : The modification of damage caused by primary ionization of biological targets. *Rad. Res.* 5 573-586 (1956)
- (6) Appleyard, R.K. : The irradiation of dried hemoglobin by fast charged particles II. *Arch. Biochem. Biophys.* 40 111-126 (1952)
- (7) Augenstine, L. : Structural interpretations of denaturation data. *Information Theory in Biology* (H. Quastler, ed.) Univ. Illinois Press. Urbana. 119-124 (1953)
- (8) Augenstine, L.G. : A proposed mechanism of protein inactivation. *Symposium on Information Theory* (H.P. Jockey; R.L. Platzman & H. Quastler, eds.) Pergamon Press New York 287-292 (1958)
- (9) Augenstine, L.G. : Indirect inactivation of macromolecules in solution by ionizing radiation. *Rad. Res.* 10 89-111 (1959)
- (10) Augenstine, L.G. : Structural correlation between esterase and protease activities of trypsin *Science* 129 718-719 (1959)
- (11) Augenstine, L.G.; Garter, J.G.; Nelson, D.R.; Yockey, H.P. : Radiation effects at the macromolecular level. *Symposium on Bioenergetics* (L.G. Augenstine, ed.) Acad. Press New York 1960, *Rad. Res. Supp.* 2 19-48 (1960)

- (12) Bacq, Z.M.; Alexander, P. : Fundamentals of Radiobiology.
Pergamon Press London (1961)
- (13) Barron, E.S.G. : The effect of ionizing radiation on some system
of biological importance. Symp. on Radiobiol. (Nickson,
J.J. ed.) John Wiley & Sons New York 216-240 (1952)
- (14) Barron, E.S.G. : The effect of ionizing radiations on systems of
biological importance. Ann.N.Y.Acad.Sci. 59
574-594 (1955)
- (15) Beisenherz, G.; Boltze, H.J.; Bücher, Th.; Czok, R.; Garbade, K.H.;
Meyer-Arendt, M.; Pfleiderer, G. : Diphosphofructose-Aldo-
lase, Phosphoglycerinaldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-
Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyru-
vat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang.
Z.Naturf. 8b 555-577 (1953)
- (16) Benzer, S. : Resistance to ultraviolet light as an index to the re-
production of bacteriophage. J.bacteriol. 63
59-72 (1952)
- (17) Blau, M.; Altenburger, K. : Über einige Wirkungen von Strahlen II.
Z.f.Physik 12 315-329 (1923)
- (18) Braams, R.; Hutchinson, F.; Ray, D.K. : Changes in the sensitivity of
enzymes in the dry state to radiation. Nature 182
1506 (1958)
- (19) Brustad, T. : A study of the radiosensitivity of dry preparations
of lysozyme, trypsin and deoxyribonuclease exposed
to accelerated nuclei of hydrogen, helium, carbon,
oxygen and neon. Rad.Res. Supp. 2 65-74 (1960)
- (20) Brustad, T. : Molecular and cellular effects of fast charged parti-
cles. Rad.Res. 15 139-158 (1961)
- (21) Butler, J.A.V.; Robins, A.B. : Effect of oxygen on the inactivation
of trypsin by ionizing radiation. Nature 186
697-698 (1960)
- (22) Butler, J.A.V.; Robins, A.B.; Rotblat, J. : The inactivation of α -
chymotrypsin by ionizing radiations. Proc. Roy. Soc.
London. A256 1- 14 (1960)
- (23) Butler, J.A.V.; Robins, A.B. : Effects of oxygen on the inactivation
of enzymes by ionizing radiations. II. solid trypsin
and deoxyribonuclease. Rad.Res. 17 63-73 (1962)
- (24) Clark, H.; Northrop, J.H. : The inactivation of trypsin by X-rays
J.Gen.Physiol. 2 87-96 (1926)

- (25) Condon, E.U.; Terril, H.M. : Quantum phenomena in the biological action of X-rays. *J.Cancer Res.* 11 324-333 (1927)
- (26) Crowther, J.A. : Some considerations relative to the action of X-rays on tissue cells. *Proc.Roy.Soc.* B96 207-211 (1924)
- (27) Crowther, J.A. : The action of X-rays on colpodium colpode. *Proc.Roy.Soc.* B100 390-404 (1926)
- (28) Crowther, J.A. : The biological action of X-rays. A theoretical reviews. *Brit.J.Radiol.* 11 132-145 (1938)
- (29) Dale, W.M. : The effect of X-rays on enzymes. *Biochem.J.* 34 1367-1373 (1940)
- (30) Dale, W.M. : The effect of X-rays on the conjugated protein d-amino acid oxidase. *Biochem.J.* 36 80-85 (1942)
- (31) Dale, W.M.; Meredith, W.J.; Tweedie, A.C.K. : Mode of action of ionizing radiations on aqueous solutions. *Nature* 151 280-281 (1943)
- (32) Dale, W.M.; Gray, L.H.; Meredith, W.J. : The inactivation of an enzyme(carboxypeptidase) by X- and α -radiation. *Phil.Trans.Roy.Soc.London.* A242 33-62 (1949)
- (33) Dale, W.M. : The effects of ionizing radiations on enzymes in vitro. *Ciba Foundation Symp.* 25-37 (1956)
- (34) Dale, W.M. : Survey of action of ionizing radiations in aqueous systems and some considerations of energy transfer. *Rad.Res.Supp.* 2 578-585 (1960)
- (35) Delbrück, M. : Radiation and the hereditary mechanism. *Amer. Naturalist* 74 350-362 (1940)
- (36) Dessauer, F. : Über einige Wirkungen von Strahlen I. *Z.f.Physik* 38-47 (1923)
- (37) Dittrich, W. : Treffermischkurven. *Z.Naturf.* 15b 261-266 (1960)
- (38) Fricke, H.; Petersen, B.W. : Action of X-rays on haemoglobin. *Amer. J.Roentg.* 17 611-620 (1927) ; Fricke, H & Morse, S.; Action of X-rays on ferrous sulfate solution. *ibid.* 18 426-430 (1927)
- (39) Fricke, H. : The chemical-physical foundation for the biological effects of X-rays. *Cold Spring Harbor Symp.* 2 241-246 (1934)
- (40) Glocker, R. : Quantenphysik der biologischen Röntgenstrahlenwirkung. *Z.f.Physik* 77 653-675 (1932)

- (41) Glocker, R. : Die physikalischen Grundlagen der Strahlenbiologie.
Strahlenther. 48 1-14 (1933)
- (42) Gordy, W.; Ard, W.B.; Schields, H.S. : Microwave spectroscopy of biological substances I. Paramagnetic resonance in X-irradiated amino acids and proteins.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 41 983-1004 (1955)
- (43) Gordy, W.; Schields, H. : Electron spin resonance studies of radiation damage to proteins. Rad. es. 2 611-625 (1958)
- (44) Hall, T.A. : The interpretation of exponential dose-effect curves.
Bull. Math.Biophys. 15 43-47 (1953)
- (45) Heuse, O. : Eine neue Röntgenröhre hoher Leistung mit rotierender, wassergekühlter Membrananode für strahlenbiologische Untersuchungen. Z.f.angew.Physik. 7 387-389 (1955)
- (46) Heuß, K. : Eine Ionisationskammer zur Messung hoher Dosisleistungen.
Strahlenther. 108 556-558 (1959)
- (47) Holmes, B. : Inactivation of ribonuclease in dilute aqueous solutions.
Action of X-rays. Nature 165 266-267 (1950)
- (48) Holzer, H.; Haan, J.; Schneider, S. : Zum Mechanismus des anaeroben Glukose- und Fructose-Abbaues im Mäuse-Mesotheliom-Carcinom. Biochem.Z. 326 451-463 (1955)
- (49) Howard-Flanders, P. : Effect of nitric oxide on the radiosensitivity of bacteria. Nature 180 1191-1192 (1957)
- (50) Howard-Flanders, P; Jockey, J. : Similarities in the effects of oxygen and nitric oxide on the rate of inactivation of vegetative bacteria by X-rays. Rad.Res. 13 466-478 (1960)
- (51) Hunt, J.W.; Tall, J.E.; Williams, J.F. : Radiation damage and free radical production in irradiated ribonuclease.
Rad.Res. 17 703-711 (1962)
- (52) Hussey, R.G.; Thompson, W.R. : The effect of radioactive radiations and X-rays on enzymes: I. The effect of radiations from Radium emanation on solution of trypsin. J.gen. Physiol. 5 647-659(1923), II.the effect of radiations from radium emanation on pepsin in solution. ibcd. 6 1-5 (1924), IV.The effect of radiations from radium emanation on solution of invertase. ibcd. 2 211-215 (1926)

- (53) Hutchinson, F. : Energy requirements for the inactivation of bovine serum albumin by radiation. Rad.Res. 1 43-52 (1954)
- (54) Hutchinson, F. : Radiation sensitivity of molecules in intact cells. Adv.Radiobiol.(G.v.Hevesy et al.eds.) Oliver & Boyd. Edinburgh. 3-7 (1957)
- (55) Hutchinson, F.; Preston, A.; Vogel, B. : Radiationsensitivity of enzymes in wet and dry yeast cells. Rad.Res. 7 465-472 (1957)
- (56) Hutchinson, F. : The distance that a radical formed by ionizing radiation can diffuse in a yeast cell. Rad.Res. 7 473-483 (1957)
- (57) Hutchinson, F. : Reduced yield in dilute solutions irradiated at very high dose rates. Rad.Res. 9 13-23 (1958)
- (58) Hutchinson, F.; Ross, D.A. : Some kinetics of the indirect effect of ionizing radiation on aqueous solutions. Rad.Res. 10 477-489 (1959)
- (59) Hutchinson, F. : Radiation inactivation of molecules in cells. Amer. Naturalist 94 59-70 (1960)
- (60) Hutchinson, F. : Modifying factors in the inactivation of biological macromolecules. Rad.Res. Supp.2 49-64 (1960)
- (61) Hutchinson, F.; Norcross, C. : Inactivation by ionizing radiation of coenzyme A in various cells. Rad.Res. 12 13-19 (1960)
- (62) Hutchinson, F.; Pollard, E. : Target theory and radiation effects on biological molecules. Mechanism in Radiobiol. (M.Errea et al. eds.) Acad.Press New York. vol.1. (1961)
- (63) Hutchinson, F.; Watts, E. : The effects of oxygen and some other gases on the radiation sensitivity of dry trypsin. Rad.Res. 14 803-812 (1961)
- (64) Hutchinson, F. : Sulfhydryl groups and the oxygen effect on irradiated dilute solutions of enzymes and nucleic acids. Rad.Res. 14 721-751 (1961)
- (65) Langendorff, H.; Sommermeyer, K. : Strahlenwirkung auf Drosophila-eier IV. Die experimentelle Schädigungskurve und der biologische Zeitfaktor bei der Einwirkung von Röntgenstrahlen auf Drosophilaeier. Strahlenther. 68 42-52 (1940)

- (66) Lea, D.E. : Action of radiations on living cells. 2nd ed.
Cambridge Univ. Press (1956)
- (67) Lea, D.E. : The inactivation of viruses in relation to the mechanism of biological action of radiation. Brit.J.Radiol. Suppl. 1 35-40 (1947)
- (68) Mass, H.; Höhne, G.; Künkel, H.A. : Über die Strahlenempfindlichkeit von Enzymen der Rattenleber. Z.Naturf. 11b 593-598 (1956)
- (69) McDonald, M.R. : The inactivation of dilute solutions of crystalline trypsin by X-radiation. (Abstract) Rad. Res. 3 337 (1955)
- (70) Moore, E.C.; McDonald, M.R. : The inactivation of dilute solution of crystalline chymotrypsin by X-radiation. Rad. Res. 38-43 (1955)
- (71) Okada, S. : Inactivation of deoxyribonuclease by X-rays. I. The mechanism of inactivation in aqueous solution. Arch. Biochem. Biophys. 67 95-101 (1957)
- (72) Okada, S.; Fletcher, G.L. : Radiation inactivation of deoxyribonuclease in dry and hydrated states. Rad. Res. 13 92-98 (1960)
- (73) Pauly, H. : Der Einfluß hoher Dosen von Röntgenstrahlen auf die Gewebeatmung. Beiheft der Fortschr. Gebiete Röntgenstrahlen 81 Supp. 51-52 (1954)
- (74) Pauly, H.; Rajewsky, B. : Über die Röntgen-Inaktivierung der Arginin-, und Trypsin-Dekarboxylase. Strahlenther. Sonderbd. 35 220-226 (1956)
- (75) Pauly, H.; Rajewsky, B. : The effect of X-radiation on metabolism and on enzymes. Prog. Radiobiol. (J.A. Mitchell et al eds.) Oliver & Boyd, Edinburgh 32-41 (1956)
- (76) Pauly, H.; Rajewsky, B. : Die Beeinflussung der Gewebeatmung durch Röntgenstrahlen. Strahlenther. 99 383-386 (1956)
- (77) Pauly, H.; Rajewsky, B. : Die Einwirkung der Röntgenstrahlen auf den Zellstoffwechsel und auf Enzyme. Jahrbuch 1958 der Max Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. 127-183 (1958)
- (78) Pauly, H. : Über elementare Mechanismen der Strahlenwirkung in der lebenden Zelle. Habilitationsschrift. Frankfurt/M. (1959)

- (79) Pauly, H.; Rajewsky, B. : Application of the target theory to multi-step reactions. Rad.Res. 18 409-420 (1963)
- (80) Pauly, H.; persönliche Mitteilungen : (80-1) Robinson, T. u. Philips, A. W. Biochem. Biophys. Acta 42 (1960) 290; (80-2) Temperli, A. u. Aebi, H. u. Zuppinger, A. Helvetica chimica Acta. 44 (1961) 1573-1582; (80-3) Rabani, I. u. Stein, G. Rad. Res. 17 (1962) 327; (80-4) Warburg, O. u. Schröder, W. u. Gattung, H. W. Z. Naturf. 15b (1961) 163.
- (81) Platzman, R. L.; Frank, J. : A physical mechanism for the inactivation of proteins by ionizing radiation. Symp. Information theory (Jocky, H. P. et al eds.) Pergamon Press 262-275 (1958)
- (82) Pollard, E.; Buzzell, A.; Jeffreys, C.; Forro, F. : Inactivation of pepsin and trypsin by deuteron and electron bombardment. Arch. Biochem. Biophys. 33 9-21 (1951)
- (83) Pollard, E. C.; Powell, W. F.; Reaume, S. H. : The physical inactivation of invertase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 38 173-180 (1952)
- (84) Pollard, E. C. : Primary ionization as a test of molecular organization. Adv. biol. med. Phys. vol. III. Acad. Press 153-189 (1953)
- (85) Pollard, E. C.; Guild, W. R.; Hutchinson, F.; Setlow, R. B. : The direct action of ionizing radiation on enzymes and antigens. Prog. Biophys. biophys. Chemistry. 5 Pergamon Press 72-108 (1955)
- (86) Rajewsky, B. : Untersuchungen über das Grundproblem der biologischen Strahlenwirkung. II. physikalische Darstellung des Schädigungsvorganges und ihre experimentelle Prüfung. 10 Jahre Forschung (F. Dessauer,) G. Thieme Verlag Leipzig 202-235 (1931)
- (87) Rajewsky, B.; Dänzer, H. : Über einige Wirkungen von Strahlen VI. Eine Erweiterung der statistischen Theorie der biologischen Strahlenwirkung. I. Z. f. Physik 89 412-420 (1934)
- (88) Rajewsky, B. : Grundfragen der Treffertheorie der biologischen Strahlenwirkung. Biophysik (B. Rajewsky) I. 9-14 (1948)

- (89) Rajewsky, B. : The limits of the target theory of biological action of radiation. Brit.J.Radiol. 25 550-552 (1952)
- (90) Rajewsky, B.; Reinholz, E. : Beiträge zur indirekten Strahlenwirkung. I. Röntgenbestrahlung biologischer Objekte in fester Phase. Strahlenther. 25 132-147 (1954)
- (91) Rajewsky, B.; Gerber, G.; Larchwitz, K.H.; Pauly, H. : Röntgenstrahlen-Inaktivierung der Bersteinsäure-Oxydase in den Mitochondrien der Rattenleber und des Blütertumors. Z.Naturf. 11b 415-416 (1956)
- (92) Rajewsky, B. : Neue Gesichtspunkte zur Deutung des biophysikalischen Mechanismus der Strahlenwirkung im lebenden Gewebe. Strahlenther. Sonderbd. 35 156-167 (1956)
- (93) Rajewsky, B.; Gerber, G.; Pauly, H. : X-ray inactivation of the components of the succinic acid dehydrogenase-cytochrome oxidase-system. Adv. Radiobiol. (G.C. de Mevesy et al eds.) Oliver & Boyd. Edinburgh. 25-32 (1957)
- (94) Ray, D.K.; Hutchinson, E.; Morowitz, H.J. : A connexion between S-S bond breakage and radiation inactivation by radiation of a dry enzyme. Nature 186 312-313 (1960)
- (95) Risse, O. : Einige Bemerkungen zum Mechanismus chemischer Röntgenreaktionen in wäßrigen Lösungen. Strahlenther. 34 578-581 (1929)
- (96) Robins, A.B.; Butler, J.A.V. : Effect of oxygen on the inactivation of enzymes by ionizing radiation. I. Dilute solutions of trypsin and DNase. Rad.Res. 16 7-17 (1962)
- (97) Serlin, I.; Cotzias, G.C. : State of tissue acetylcholinesterase as determined by cobalt-60 gamma radiation inactivation. Rad.Res. 6 55-66 (1957)
- (98) Setlow, R.B. : The Inactivation of catalase by deuterium and heat. Arch.Biochem.Biophys. 34 396-408 (1951)
- (99) Setlow, R.B. : The radiation sensitivity of catalase as a function of temperature. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 38 166-172 (1952)
- (100) Setlow, R.B. : The inactivation of urease by deuterium and heat. Arch.Biochem.Biophys. 36 328-335 (1952)
- (101) Setlow, R.B. : A relation between cystine content and ultraviolet sensitivity of proteins. Biochem.Biophys.Acta. 16 444-445 (1955)

- (102) Setlow, R.B.; Doyle, B. : The direct action of fast charged particles on hyaluronic acid, hyaluronidase and a combination of the enzyme and substrate. Rad.Res. 2 15-25 (1955)
- (103) Setlow, R.B.; Doyle, B. : The action of monochromatic ultraviolet light on proteins. Biochem.Biophys.Acta. 24 27-41 (1957)
- (104) Setlow, R.B. : Ultraviolet wave-length dependent effects on proteins and nucleic acids. Rad.Res. Supp.2 276-289 (1960)
- (105) Six, E. : Zur Treffertheorie der indirekten Strahlenwirkung. Z.Naturf. 9b 265-275 (1954)
- (106) Sommermeyer, K. : Quantenvorgänge bei der biologischen Strahlenwirkung. Z.f.Physik 109 332-340 (1938)
- (107) Sommermeyer, K. : Die Entwicklung der Treffertheorie seit dem Jahre 1946 unter besonderer Berücksichtigung ihrer Anwendung auf die biologische Wirkung energiereicher Strahlen. Strahlenbiol.Strahlenther. Nuklearmed. u. Krebsforsch. Ergebnisse 1952-1958 (H.R.Schinz et al) G.Thieme Verlag, Stuttgart. 1-65 (1959)
- (108) Sutton, H.C. : Discussions of the Faraday society. 12 281 (1952) Radiation Chemistry Aberdeen Univ.Press.
- (109) Tallentire, A.; Davies, D.J.G. : A postirradiation oxygen effect in bacterial spores and its dependence on water content. Exp.Cell Res. 24 148-150 (1961)
- (110) Timofeeff-Ressovsky, N.W.; Zimmer, K.G. : Biophysik I. Das Trefferprinzip in der Biologie. s.Hirzel Verlag. Leipzig (1947)
- (111) Tobias, C.A. : The dependence of some biological effects of radiation on the rate of energy loss. Symp.Radiobiol. (J.J.Nickson.ed.) John Wiley & Sons New York. 357-384 (1952)
- (112) Wallenstein, M.; Wahrhaftig, A.L.; Rosenstock, H.; Eyring, H. : Chemical reaction in the gas phase connected with ionization. Symp. Radiobiol.(J.J.Nickson.ed.) John Wiley & Sons. New York 70-96 (1952)
- (113) Warburg, O.; Christian, W.; Griese, A. : Wasserstoffübertragendes Co-Ferment, seine Zusammensetzung und Wirkungsweisen. Biochem.Z. 282 157-205 (1935)

- (114) Warburg, O ; Christian, W. : Isolierung und Kristallisation des Proteins des oxydierenden Gärungsfermentes.
Biochem.Z. 303 40-68 (1939)
- (115) Warburg, O.; Christian, W. : Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Zymohexase.
Biochem.Z. 314 149-176 (1943)
- (116) Weiss, J. : Radiochemistry of aqueous solutions. Nature 153
748-750 (1944)
- (117) Weiss, J. : Bernstein, W. : The current status of W the energy to produce one ion pair in a gas. Rad.Res. 6
603-610 (1957)
- (118) Wijsman, R.A. : Probability that two diffusing molecules will collide. Bull.Math.Biophys. 14 121-126 (1952)
- (119) Wilson, D.E. : The effect of ionizing radiation on the enzyme deoxyribonuclease in the dry state.
Intern.J.Radiation Biol. 1 360-365 (1960)
- (120) Wilson, C.T.R. : Investigation on X-rays and β -rays by the cloud method. I. X-rays.
Proc.Roy.Soci. A104 1-24 (1923)
- (121) Zirkle, R.E.; Tobias, C.A. : Effects of ploidy and linear energy transfer on radiobiological survival curves.
Arch.Biochem.Biophys. 47 282-302 (1953)
- (122) Kirkman, H.N. ; Hendrickson, E.B. : Glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes.
J.Biological Chem. 237 2371-2376 (1962)

An dieser Stelle möchte ich meinem hochverehrten Lehrer,
Herrn Professor Dr.Dr.Dr.Dr.Dr. B. R a j e w s k y, meinen herzlichen
Dank für die Überlassung der Bearbeitung eines lehrreichen Themas,
für sein stets wohlwollendes Interesse und für die großzügigen
Unterstützung meiner Arbeit aussprechen. Es war eine große Ehre
und Freude die vorliegende Arbeit unter seiner Leitung am Max Planck-
Institut für Biophysik durchführen zu können.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Professor Dr.Dr. H. P a u l y
für seine freundliche Betreuung, für viele Ratschläge und seine
ständige Bereitschaft, durch Diskussionen den Fortgang meiner Arbeit
zu fördern.

Herrn Diplom-Physiker H.P f i s t e r, Herrn Diplom-Physiker G.H a s l,
Herrn Diplom-Physiker A.K a p p o s und Herrn cand.rer.nat.P.G e c k
danke ich für ihre freundschaftlichen Ratschläge.

Meine Aufenthalt in Max Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt am
Main 1961-1964 wurde durch finanzielle Unterstützungen des National
Atomenergie-Forschungsinstituts von Korea, der Alexander von Humboldt-
Stiftung und der Max Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften
e.V. ermöglicht. An dieser Stelle möchte ich meinen herzlichen Dank
aussprechen.

Mein Lebenslauf

Als erster Sohn des Gymnasialdirektors Heun-Koo Lee wurde ich am 3.4.1934 in Seoul, Korea geboren.

Vom 1.4.1941 bis zum 31.3.1947 besuchte ich dort die Volksschule.

Im Anschluss daran besuchte ich bis zum 31.3.1953 die Mittelschule und das Kyung-Gi Gymnasium, Seoul, Korea.

Im April 1953 wurde ich in die premedizinische Abteilung der philosophischen-, und naturwissenschaftlichen Fakultät der Seoul National Universität aufgenommen und besuchte diese bis zum 30.3.1955.

Am 16.2.1955 bestand ich das Staatsexamen für das Lehramt der philosophischen Abteilung an höheren Schulen.

Vom 1.4.1955 ab studierte ich Medizin in der medizinischen Fakultät der gleichen Universität und legte dort am 4.4.1959 mein medizinisches Staatsexamen ab.

Am 28. März 1959 erhielt ich den akademischen Grad eines Doktors der Medizin (M.D.) nach Bestehen eines ordnungsmäßigen Examens.

Nach der ordnungsmäßigen Beendigung des Studiums trat ich in die "postgraduate school" der gleichen Universität ein und arbeitete wissenschaftlich bei Prof. Dr. C.W. Myung in der Nervenklīnik.

Seit dem 1.2.1961 arbeite ich - nach Absolvierung eines deutschen Sprachkurses in München - im Max Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt am Main unter der Leitung der Prof. Dr. B. Rajewsky.

Meine Arbeiten beschäftigen sich mit dem Einfluß der ionisierenden Strahlen auf den Zellstoffwechsel, um auf diese Weise einen Einblick in die Prozesse zu erhalten, die nach einer Röntgenbestrahlung in den Nervenzellen und im Nervensystem ablaufen.

Frankfurt am Main, den 3.11.1964

Sangbok Lee
(Sangbok L e e, M.D.)

Anschrift: 6 Frankfurt am Main, Dreikönigstr. 55

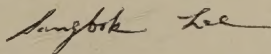
Heimatanschrift: 299, 5-Ka, Samsun-Dong, Sungbuk-Ku, Seoul, Korea

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die der Medizinischen Fakultät Frankfurt/Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel: " Über die Strahlenempfindlichkeit von Enzymen in der Zelle" im Max Planck-Institut für Biophysik unter Leitung von Herr Prof. Dr.Dr.Dr.Dr.Dr.E.Rajewsky mit Unterstützung durch ein Stipendium vom National Atomenergie-Institut, Seoul,Korea und ein Stipendium der Alexander von Humboldt-Stiftung ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner inländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Die vorliegende Arbeit wird in der Zeitschrift " Biophysik " veröffentlicht.

Frankfurt am Main, den 2.11.1964



(Sangbok Lee M.D.)

